

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

dr Goran Z. Milošević

UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZNAČAJNIH
ZA FARMAKOKINETIKU 6-
MEREKTOPURINA NA LEČENJE AKUTNE
LIMFOBLASTNE LEUKEMIJE U DECE

doktorska disertacija

Beograd, 2019. godina

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

dr Goran Z. Milošević

INFLUENCE OF VARIANTS IN GENES
IMPORTANT FOR FARMACOKINETICS OF 6-
MERCAPTOPURINE ON ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATMENT IN
CHILDREN

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor: Prof. dr Lidija Krivokapić Dokmanović, pedijatar-hematolog, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor: Prof. dr Milica Bajčetić, farmakolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Dragana Janić, pedijatar-hematolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

Prof. dr Nada Krstovski, pedijatar-hematolog, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu , Univerzitetska dečja klinika, Beograd

Prof. dr Nina Žigon farmakolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Beograd

Dr sci. Sonja Pavlović, viši naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetički inženjering, Beograd

Prof. dr Vladimir Jurišić, internista-hematolog, naučni savetnik iz oblasti onkologije, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

ZAHVALJUJEM SE

Mentoru, prof. dr Lidiji Krivokapić Dokmanović na ukazanom poverenju i strpljenju, bez čije bi pomoći ulazak u vode pedijatrijske hematologije i onkologije bio teško ostvariv zadatak.

Komentoru, prof. dr Milici Bajčetić, na nesebičnoj pomoći u izradi ovog doktorata, kao i na pomoći u započinjanju rada u oblasti pedijatrijske medicinske farmakologije.

Prof. dr Dragani Janić, prof. dr Nadi Krstovski i doc. dr Jeleni Lazić na prijateljskim savetima i nesebičnoj pomoći u svakodnevnom kliničkom radu.

Dr. sci Sonji Pavlović NS i dr. sci Nikoli Koturu, koji su me uveli u svet molekularne biologije i bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Dr. sci Predragu Rodiću, dr. sci Srđi Janković i dr Jeleni Krcunović na nesebičnoj pomoći, kolegijalnosti i prijateljstvu, koji svakodnevni klinički rad ispunjavaju zadovoljstvom i lagodnošću.

Medicinskim sestrama i tehničarima Službe za hematologiju i onkologiju, koji u svakodnevni posao sa pacijentima unose lakoću i toplinu.

Svojoj porodici i prijateljima, na безусловnoj podršci i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZNAČAJNIH ZA FARMAKOKINETIKU 6-MERKAPTOPURINA NA LEČENJE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEUKEMIJE U DECE

Rezime

Uvod: Akutna limfoblastna leukemija (ALL) predstavlja najčešću malignu bolest dečjeg doba. Akutna limfoblastna leukemija je klonalna maligna bolest hematopoetskog tkiva, koja se odlikuje klonalnom proliferacijom limfoblasta. a na osnovu njihovih imunofenotipskih karakteristika može se podeliti na B-ćelijske i T-ćelijske. Najčešći oblik akutne limfoblastne leukemije kod dece je B ćelijska prekursorska leukemija. Najčešće se javlja u uzrastu od druge do pete godine života i nešto je češća kod dečaka. Optimalna primena antileukemijskih lekova u sklopu jasno definisanih terapijskih protokola i precizna stratifikacija bolesnika u grupe rizika, uz maksimalnu suportivnu terapiju doveli su do značajnog porasta ukupnog preživljavanja koje sada iznosi i do 90%. Lečenje leukemije kod dece se sastoji iz četiri faze, od kojih je poslednja i najduža, faza održavanja u čijem sklopu se primenjuje lek iz grupe tiopurina – 6-merkaptopurin (6-MP). Toksični efekti ovog leka, pre svega mijelosupresija, kod izvesnog broja dece mogu dovesti do životno ugrožavajućih infekcija kao i do značajnog odlaganja terapije i povećanja rizika za nastanak recidiva bolesti. Enzim tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) je najznačajni enzim za inaktivaciju 6-MP i poznato je da deca koja imaju sniženu aktivnost enzima, imaju izraženije toksične efekte i zahtevaju primenu manjih doza 6-MP. Individualizovana terapija na osnovu TPMT genotipa je postala standard u lečenju akutne limfoblastne leukemije u dece. Osim enzima TPMT, postoji još nekoliko metaboličkih puteva u inaktivaciji i transportu 6-MP koji mogu uticati na povećanu toksičnost tokom primene leka. Inozin trifosfat pirofosfataza je drugi enzim, kodiran od strane *ITPA* gena, koji inaktiviše 6-MP, i nedovoljna aktivnost ovog enzima takođe doprinosi pojavi izražene mijelotoksičnosti tokom primene 6-MP. P-glikoprotein, kodiran od strane *ABCC4* gena, i Multidrug Resistance Protein 4, kodiran od strane *ABCB1* gena su transmembranski proteini koji funkcionišu kao efluks pumpe i izbacuju ksenobiotike iz ćelija. Povećana odnosno smanjena aktivnost ovih proteina može dovesti do smanjenog terapijskog efekta lekova odnosno do povećane toksičnosti tokom primene 6-MP. Cilj ovog istraživanja je bio da utvrdi učestalost varijacija u genima *TPMT*, *ITPA*, *ABCC4* i

ABCB1 kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije i njihov uticaj na intenzitet toksičnih efekata 6-MP kao i na ukupno preživljavanje.

Materijal i metod: U ovo istraživanje je uključeno 68 dece kod kojih je postavljena dijagnoza akutne limfoblastne leukemije i koja su lečena u Službi za hematologiju i onkologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, u periodu od januara 2003. godine do januara 2013. godine. Lečenje dece je sprovedeno primenom odgovarajućih protokola ALL IC-BFM 2002 ili ALL IC-BFM 2009 u skladu sa grupama rizika. U toku terapije održavanja svi bolesnici su bili na terapiji 6-MP, jednom dnevno u dozi u 50 mg/m^2 i metotreksatom, jednom nedeljno u dozi od 20 mg/m^2 . Lekovi su primenjivani oralnim putem u vidu tableta. Tokom faze održavanja, terapijski cilj je bila leukopenija između $2,0 \times 10^9/\text{L}$ i $3,0 \times 10^9/\text{L}$. Željena leukopenija je održavana redovnim kontrolama krvne slike na svake dve nedelje tokom čitave terapije održavanja i eventualnim korekcijama doze lekova u skladu sa brojem leukocita po protokolu. *TPMT* genotip je određivan svim pacijentima pre započinjanja terapije održavanja i doza 6-MP je korigovana shodno genotipu i preporukama. Toksičnost i neželjeni događaji su praćeni koristeći surogat markere (broj nedelja bez terapije, broj epizoda leukopenije, prosečna doza 6-MP – izražena u procentima). Genetičke varijante su detektovane metodom lančane reakcije polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) koja je praćena analizom polimorfizma dužine restrikcioniha fragmenata. Kao matrica za PCR reakciju je korišćena prečišćena DNK ALL pacijenata i zdravih ispitanika. DNK je izolovana iz uzoraka krvi, koštane srži, bukalnog brisa ili krvnih razmaza koristeći *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) ili metodom izolovanja. Ukupno je proćavano pet varijanti u četiri gena: *TPMT* c.460 G>A, *TPMT* c.719 A>G, *ITPA* c.94 C>A, *ABCC4* c.*1372 T>G i *ABCB1* 2677 G>T. U analizi rezultata korišćeni su odgovarajući statistički testovi u skladu sa karakteristikama varijabli i obeležja.

Rezultati: Naše istraživanje je potvrdilo da bolesnici koji boluju od akutne limfoblastne leukemije i nosioci su za neaktivni *TPMT* alel, zahtevaju redukciju doze 6-MP u toku terapije održavanja. U kohorti naših bolesnika detektovali smo četiri bolesnika sa varijantom u *TPMT* genu, što iznosi 5,8%. Tri od ta četiri bolesnika su nosioci *TPMT**3A a jedan bolesnik je nosilac *TPMT**3C varijante. Nije postojala razlika u toksičnosti u odnosu na *TPMT* genotip, što je i oćeivano jer su doze 6-merkaptopurina bile

prilagođene genotipu. Učestalost varijante u genu *ITPA* kod naših bolesnika je detektovana u pet bolesnika što iznosi 7%. Nije pokazana povezanost ove varijante sa povećanim toksičnim efektima 6-MP. Genetička varijanta u genu *ABCC4* takođe nije pokazala povezanost sa povećanom toksičnošću. Varijante *ABCC4* c.*1372GG i *ABCC4* c.*1372TG su detektovane u 5% odnosno 35% u našoj grupi bolesnika. Nosioci varijante u genu *ABCB1* su imali izraženiju hepatotoksičnost u odnosu na nosioce *wild type* alela. Varijante *ABCB1*c.2677TT i *ABCB1*c.2677GT su bile prisutne u 19% odnosno 38% bolesnika. Primena predikcionih modela u kojima smo koristili gore nabrojane genske varijante kao ulazne varijable, omogućila je prepoznavanje bolesnika koji su u povećanom riziku da razviju izražene toksične efekte tokom terapije 6-merkaptopurinom u 71% situacija.

Zaključak: Ovom studijom je učinjeno istraživanje potencijalnih farmakogenomskih markera koji bi omogućili bolje lečenje dece obolele od akutne limfoblastne leukemije. Iako nismo dokazali univarijantnu zavisnost toksičnih efekata i postojanja varijanti u genima od interesa za farmakokinetiku 6-merkaptopurina, pokazali smo da se kombinovanjem ovih genskih markera i korišćenjem odgovarajućih predikcionih metoda mogu predvideti rizici za povećan toksični efekat terapije 6-merkaptopurinom. Ova studija doprinosi stvaranju panela farmakogenomskih markera koji će omogućiti personalizovan pristup svakom bolesniku a na osnovu individualnog genskog profila sa ciljem predviđanje 6-merkaptopurinom indukovane toksičnosti kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije.

Ključne reči: akutna limfoblastna leukemija kod dece, 6-merkaptopurin, toksičnost, farmakogenomika, *TPMT*, *ITPA*, *ABCC4*, *ABCB1*

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: medicinska farmakologija

INFLUENCE OF VARIANTS IN GENES IMPORTANT FOR FARMACOKINETICS OF 6-MERCAPTOPYRINE ON ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATMENT IN CHILDREN

Summary

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia is the most common childhood malignancy. Acute lymphoblastic leukemia is malignant clonal disease of hematopoietic tissue and it is characterized by clonal proliferation of lymphoblasts, which can be of B-cell or T-cell origin. The most prevalent type of acute lymphoblastic leukemia in children is B-cell precursor leukemia. It is most commonly seen in children between age of two and five and there is slight male predominance. Optimal use of antileukemic drugs in the settings of clearly defined therapeutic protocols and precise risk stratification with maximal supportive therapy have led to significant improvement in overall survival, which is now near 90%. Leukemia treatment consists of four phases and last and longest phase is maintenance phase. In this phase, the most important drug is 6-mercaptopurine (6-MP) which belongs to the group of thiopurine drugs. 6-MP induced toxicity, myelosuppression as the most prominent one, can in one number of children lead to life-threatening infections as well as significant therapy delay which contributes to increased risk for relapse. Enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT) is most important inactivation enzyme for 6-MP and it is well established that children with TPMT deficiency have more pronounced toxicity and require lower dose of 6-MP. Personalized therapy based on TPMT genotype has become standard in treatment of acute lymphoblastic leukemia in children. Besides inactivation pathway that utilizes TPMT there are several other metabolic pathways for inactivation and transport mechanisms that can influence toxicity profile of 6-MP. Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA), which is coded by *ITPA* gene, is one of those 6-MP inactivation enzymes which, when deficient, can contribute to profound myelotoxicity. P-glycoprotein, coded by *ABCC4* gene, and Multidrug Resistance Protein 4, coded by *ABCB1* gene, are transmembrane transporters that works as efflux-pumps and removes xenobiotics from cells. Increased or reduced activity of these efflux-pumps can lead to reduced therapeutic effect or increased toxicity of 6-MP. Goal of this study was to determine frequency of variations in genes *TPMT*, *ITPA*, *ABCC4*

and *ABCB1* in children with acute lymphoblastic leukemia and their influence on 6-MP induced toxicity as well as on overall survival.

Material and methods: Sixty-eight children that were diagnosed and treated for acute lymphoblastic leukemia at Department for Hematology and Oncology of University Children's Hospital in Belgrade, in period between January 2003 and January 2013, were included in this study. Patients were treated according to ALL IC-BFM 2002 or ALL IC-BFM 2009. Maintenance phase consisted of oral 6-MP, once daily in dose of 50 mg/m² and oral methotrexate, once weekly in dose of 20 mg/m². During maintenance phase, therapeutic goal was to establish leukopenia between 2,0 x 10⁹/L and 3,0 x 10⁹/L. Regular CBC controls were performed once in two weeks and doses of drugs were adjusted accordingly. *TPMT* genotype was determined at the beginning of therapy and dose of 6-MP was adjusted according established guidelines. Toxicity and adverse events were monitored using surrogate markers (number of off-therapy weeks, number of leukopenic episodes, average dose of 6-MP). Genetic variants were detected using polymerase chain reaction (PCR) that was followed by analysis of polymorphisms of restriction fragments length. Purified DNA of ALL patients and healthy control was used as matrix for PCR reaction. DNA was isolated from blood samples, bone marrow samples, buccal swabs or blood smears using *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) or desalination method. In total, five variants in four genes were analysed: *TPMT* c.460 G>A, *TPMT* c.719 A>G, *ITPA* c.94 C>A, *ABCC4* c.*1372 T>G and *ABCB1* 2677 G>T. Appropriate statistical tests were used for results analysis.

Results: We have confirmed in this research that patients with acute lymphoblastic leukemia that are carriers of inactive *TPMT* allele, require reduced dose of 6-MP during maintenance phase of treatment. In our study group we have detected four patients carrying variant *TPMT* gene, which represents 5.8%. Three out of these four patients were carriers of *TPMT**3A genotype and one of them was carrier of *TPMT**3C genotype. There was no significant difference in terms of toxicity in regards for *TPMT* genotype. This was expected as dose of 6-MP was adjusted according to *TPMT* genotype. Frequencies of *ITPA* variant allele was 7% (five patients). This genotype was not associated with increased 6-MP induced toxicities. Genetic variants in *ABCC4* gene was not associated with increased toxicity. *ABCC4* c.*1372GG and *ABCC4* c.*1372TG variants were detected in 5% and 35%, respectively. Carriers of

variants in *ABCB1* gene had increased hepatotoxicity. Variants *ABCB1c.2677TT* and *ABCB1c.2677GT* were present in 19% and 38% of patients, respectively. Prediction models that were used in this study, used abovementioned genetic variants as input variables. These models could predict which patients were going to be in increased risk of developing 6-MP induced toxicity in 71% of cases.

Conclusion: This study performed research of potential pharmacogenomic markers that could improve treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Although it failed to demonstrate univariant correlation of 6-MP induced toxicity and presence of variant genotypes, we have showed that combining these genotypes and using appropriate prediction models, we can predict which patients are going to experience increased risk for 6-MP induced toxicities. This study contributes to develop of pharmacogenomic marker panel that could enable personalized approach to every child with leukemia based on individual genotype, with one goal in mind, to predict and reduce 6-MP induced toxicity.

Keywords: childhood acute lymphoblastic leukemia, 6-mercaptopurine, toxicity, pharmacogenomics, *TPMT*, *ITPA*, *ABCC4*, *ABCB1*

Scientific area: Medicine

Discipline: Medical pharmacology

Sadržaj

1	UVOD.....	1
1.1	AKUTNA LIMFOBLASTNA LEUKEMIJA KOD DECE	1
1.1.1	Epidemiologija ALL	3
1.1.2	Etiologija i faktori rizika za ALL	4
1.1.3	Klinička slika ALL.....	7
1.1.4	Dijagnoza i klasifikacija ALL	8
1.1.5	Morfološka klasifikacija	8
1.1.6	Imunofenotipizacija.....	8
1.1.7	Kariotip ALL	9
1.1.8	Molekularna genetika ALL.....	10
1.1.9	Procena grupe rizika	10
1.1.10	Terapija i prognoza ALL	12
1.2	FARMAKOGENOMIKA I FARMAKOGENETIKA.....	15
1.3	TIOPURINSKI LEKOVI	17
1.3.1	Mehanizam dejstva i metabolizam tiopurina.....	17
1.3.2	Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT)	20
1.3.3	Inozin trifosfat pirofosfataza (ITPA)	21
1.3.4	Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4).....	22
1.3.5	P-glikoprotein	23
2	CILJEVI	25
3	MATERIJAL I METODE.....	26
3.1	ISPITANICI	26
3.2	DETEKCIJA GENETIČKIH VARIJANTI	27
3.3	STATISTIČKA ANALIZA.....	28
4	REZULTATI	30
4.1	KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	30
4.2	TPMT	36
4.3	ITPA	39
4.4	ABCC4	41
4.5	ABCB1	43
4.6	FARMAKOGENETSKI PREDIKTIVNI MODEL ZA 6-MP INDUKOVANU TOKSIČNOST TOKOM TERAPIJE ODRŽAVANJA	46

5	DISKUSIJA	47
6	ZAKLJUČAK	53
7	LITERATURA.....	55

1 UVOD

1.1 AKUTNA LIMFOBLASTNA LEUKEMIJA KOD DECE

Leukemija je maligna klonalna bolest hematopoetskog tkiva kod koje usled poremećaja diferencijacije i proliferacije ćelija hematopoeze dolazi do zaostajanja progenitorskih ćelija hematopoeze u nekom od radnih stadijuma razvoja (1). Leukemije se, prema poreklu ćelija od kojih nastaju, dele na limfoblastne i nelimfoblastne leukemije a svaka od njih na više podtipova. Na osnovu prirodnog toka bolesti, sve leukemije se mogu podeliti na akutne i hronične. Napretkom medicine i razvojem savremenih metoda genetskih testiranja, proširena su saznanja o leukemijama, te je Svetska zdravstvena organizacija, 2016. godine izdala revidiranu klasifikaciju hematoloških malignih bolesti koja je prikazana u tabeli 1 (2).

Tabela 1. Klasifikacija mijeloidnih neoplazmi i akutnih leukemija

SZO klasifikacija mijeloidnih neoplazmi i akutnih leukemija
Mijeloproliferativne neoplazme (MPN)
Hronična mijeloidna leukemija, BCR/ABL1 +
Hronična neutrofilna leukemija
Policitemija vera
Primarna mijelofibroza
Prefibroza, rani stadijum
Manifestna fibroza
Esencijalna trombocitemija
Hronična eozinofilna leukemija, neklasifikovana
Neklasifikovana mijeloproliferativna neoplazma
Mastocitoza
Mijeloidne i limfoidne neoplazme sa eozinofilijom i rearanžmanom <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> ili <i>FGFR1</i> ili <i>PCMI-JAK2</i>
Mijeloidna/limfoidna neoplazma sa <i>PDGFRA</i> rearanžmanom
Mijeloidna/limfoidna neoplazma sa <i>PDGFRB</i> rearanžmanom
Mijeloidna/limfoidna neoplazma sa <i>FGFR1</i> rearanžmanom
Mijeloidna/limfoidna neoplazma sa <i>PCM-JAK2</i> rearanžmanom
Mijelodisplastična/mijeloproliferativna neoplazma (MDS/MPN)
Hronična mijelomonocitna leukemija
Atipična hronična mijeloidna leukemija, BCR/ABL1-
Juvenilna mijelomonocitna leukemija
MDS/MPN sa ring sideroblastima i trombocitozom

Neklasifikovani MDS/MPN
Mijelodisplastični sindrom (MDS)
MDS sa displazijom jedne loze
MDS sa ring sideroblastima (MDS-RS)
MDS-RS sa displazijom jedne loze
MDS-RS sa displazijom više loza
MDS sa displazijom više loza
MDS sa ekscesom blasta
MDS sa izolovanom delecijom 5q
Neklasifikovani MDS
Akutna mijeloidna leukemija (AML) i povezane neoplazme
AML sa ponavljajućim genskim aberacijama
AML sa t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML sa inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
AML sa <i>PML-RARA</i>
AML sa t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML sa t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML sa inv(3)(q21.3q26.2) ili t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML megakarioblastna sa t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKLI</i>
AML sa <i>BCR/ABL1</i>
AML sa mutiranim <i>NPM1</i>
AML sa bialelskom mutacijom <i>CEBPA</i>
AML sa mutiranim <i>RUNX1</i>
AML sa promenama vezanim za mijelodisplaziju
AML povezane sa terapijom
Neklasifikovane AML
AML sa minimalnom diferencijacijom
AML bez maturacije
AML sa maturacijom
Akutna mijelomonocitna leukemija
Akutna monoblastna/monocitna leukemija
Eritroidna leukemija
Akutna megakarioblastna leukemija
Akutna bazofilna leukemija
Akutna panmijeloza sa mijelofibrozom
Mijeloidni sarkom
Mijeloidne proliferacije u vezi sa Down sindromom
Prolazna abnormalna mijelopoeza
Mijeloidna leukemija povezana sa Down sindromom
Blastična plazmacitoidna neoplazma dendritičnih ćelija
Akutne leukemije nejasne loze
Akutna nediferentovana leukemija
Akutna leukemija mešovitog fenotipa (MPAL) sa t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-MPAL</i> sa t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
MPAL B/mijeloidna, neklasifikovana
MPAL T/mijeloidna, neklasifikovana

B limfoblastna leukemija/limfom

B limfoblastna leukemija/limfom, neklasifikovana

B limfoblastna leukemija/limfom sa ponavljajućim genskim aberacijama

B limfoblastna leukemija/limfom sa t(9;22)(q34.1;q11.2);*BCR-ABL1*

B limfoblastna leukemija/limfom sa t(v;11q23.3);*KMT2A* rearranged

B limfoblastna leukemija/limfom sa t(12;21)(p13.2;q22.1); *ETV6-RUNX1*

B limfoblastna leukemija/limfom sa hiperdiploidijom

B limfoblastna leukemija/limfom sa hipodiploidijom

B limfoblastna leukemija/limfom sa t(5;14)(q31.1;q32.3); *IL3-IGH*

B limfoblastna leukemija/limfom sa t(1;19)(q23;p13.3); *TCF3-PBX1*

B limfoblastna leukemija/limfom sa *BCR/ABL1-like*

B limfoblastna leukemija/limfom sa *IAMP21*

T limfoblastna leukemija/limfom

Rana T ćelijska prekursorska limfoblastna leukemija

NK ćelijska limfoblastna leukemija/limfom

(preuzeto i prilagođeno iz: *Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.*)

Akutna limfoblastna leukemija (ALL) je najčešći tip leukemije u dečjem uzrastu i čini oko 80% svih leukemija u pedijatrijskoj populaciji. ALL predstavlja klonalni poremećaj hematopoetskog tkiva, koji se odlikuje brzom proliferacijom i nagomilavanjem limfoblasta, najčešće u koštanoj srži uz mogućnost infiltracije svih organskih sistema. Limfoblast je maligna prekursorska ćelija limfoidne loze u kojoj se dogodila mutacija i koja se nekontrolisano klonalno umnožava. Na osnovu imunofenotipskih karakteristika limfoblasta, akutna limfoblastna leukemija može biti B-ćelijska i T-ćelijska u zavisnosti u kojim prekursorskim ćelijama je došlo do mutacije. B-ćelijska leukemija je najčešći podtip ALL kod dece (1).

1.1.1 Epidemiologija ALL

ALL predstavlja najčešću malignu bolest dečjeg uzrasta i čini oko 30% svih malignih bolesti dece. Incidenca ALL značajno varira u odnosu na rasu i etničku pripadnost, pa tako incidenca kod pripadnika bele rase iznosi 35,6 obolelih na milion dece, kod pripadnika crne rase 14,8, a najčešća je kod Hispano-Amerikanaca i iznosi 40,9

obolelih na milion dece (3). Najčešće se javlja u uzrastu od dve do pet godina. Bolest se češće javlja kod dečaka nego kod devojčica (55% prema 45%) (4).

1.1.2 Etiologija i faktori rizika za ALL

Etiologija ALL nije u potpunosti razjašnjena, te postoje brojne hipoteze o patofiziološkom mehanizmu nastanka ALL. Izvesno je da je ALL multifaktorijalna bolest u čijoj se etiopatogenezi ističu genetski faktori i faktori sredine. Uloga genetskih faktora u patogenezi bolesti je velika, ali u najvećem broju slučajeva ove mutacije nisu nasledne, već stečene. Kod većine pacijenata koji obole od ALL nije moguće identifikovati nasledni faktor koji bi ukazao na naslednu osnovu ili predispoziciju za nastanak bolesti. Izuzetak čine deca koja imaju trizomiju hromozoma 21 (Down sindrom) kod kojih je rizik za nastanak B ćelijske ALL, 20 do 30 puta veći nego u zdravoj populaciji (5) ili neke druge urođene sindrome kao što su neurofibromatoza tip I, Blumov sindrom, Nijemegen sindrom i ataksija-teleangiektazijaza sindrom za koje se takođe zna da imaju veći rizik za razvoj malignih bolesti, među njima i ALL. Novija istraživanja, korišćenjem savremenih genskih analiza (eng. genomwide association studies - GWAS) identifikovala su polimorfizme u određenim genima (*ARID5B*, *CEBPE*, *GATA3* i *IKZF1*) koji se mogu dovesti u vezu sa nastankom pojedinih podtipova ALL ili povećanim rizikom za ALL. Postojanje germinativne mutacije u genu *PAX5* i *ETV6* povezane su sa retkim slučajevima familijarne ALL (6).

Genetske promene koje imaju značaja u patogenezi ALL mogu biti promene u broju hromozoma (aneuploidije) ili promene u strukturi hromozoma (hromozomski rearanžmani). Ove promene se uočavaju u limfoblastima i mogu se dokazati odgovarajućim genetskim testiranjima. Primenom klasične analize kariotipa (tehnika G traka) mogu su uočiti sve aneuploidije kao i veliki hromozomski rearanžmani. Metode molekularne genetike, pre svega metoda lančane reakcije polimeraze (eng. polimerase chain reacton – PCR) ili metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) omogućavaju identifikaciju ostalih genetskih promena povezanih sa ALL (4, 7). U najčešćem i najviše

izučavanom podtipu ALL kod dece, B ćelijskoj ALL, u skoro 30% dece, analizom kariotipa koštane srži, u limfoblastima se uočava postojanje hiperdiploidije (>50 hromozoma) (8).

Knudsonova teorija dvostrukog događaja objašnjava nastajanje ALL kod jednog broja dece. Naime, ovaj model pretpostavlja da je za razvoj ALL potrebno da postoji prenatalno nastala, inicijalna lezija (prvi događaj) koji dovodi do nastanka klinički tihog preleukemijskog klonu. Da bi došlo do razvoja manifestne ALL, potrebno je da u istom ćelijskom klonu, postnatalno, dođe do razvoja nove genske promene (drugi događaj) (9). Na primeru B ćelijske ALL, identifikovan je *ETV6-RUNX1* rearanžman (ranije označavan kao *TEL-AML1* rearanžman) kao inicijalna genska promena. Ovaj rearanžman se detektuje i kod zdrave dece sa učestalošću od oko 100 puta većom nego što je učestalost ALL. Nisu dokazani uzročni agensi (lekovi, hemikalije, infekcije u trudnoći) koji se dovode u vezu sa ovim rearanžmanom, pa se smatra da je on posledica spontane, slučajne prenatalne mutacije. Ovako nastali preleukemijski klon, koji sadrži *ETV6-RUNX1* rearanžman, može da perzistira u telu osobe do 14 godina. Ukoliko se u tom periodu desi nova genska promena na istom ćelijskom klonu – leukemogeni događaj, doći će do razvoja ALL. Samo se kod malog broja osoba koje imaju preleukemijski klon desi i druga mutacija. Ovaj broj je približno 1% od osoba sa preleukemijskim klonom, što odgovara ukupnoj učestalosti ALL (10). Pretpostavlja se da se isto dešava i sa onim B ćelijskim ALL kod kojih je u osnovi hiperploidiya, kao prva genska mutacija, ali su dokazi za to nedovoljni. Za druge podtipove B ćelijske ALL, koji nemaju *ETV6-RUNX1* rearanžman i za T ćelijske ALL, ne postoje tako jasni dokazi da se patogeneza dešava na isti način, što ne isključuje primenljivost ovog modela i na ove podtipove.

Hromozomski rearanžmani, tj. genske translokacije koje učestvuju u patogenezi ALL skoro uvek zahvataju gene koji kodiraju proteine čija je osnovna uloga - uloga transkripcionih faktora. Kao rezultat translokacije dva različita gena, od kojih jedan kodira neki transkripcioni faktor, nastaju izmenjeni, himerni proteini koji imaju onkogenu aktivnost. Primer ovakve translokacije je *BCR-ABL1* rearanžman p190, čiji je rezultat

fuzioni gen koji kodira konstitucionalno aktivnu formu tirozin kinaze – transkripcionog faktora zaduženog za deobu ćelije. Obzirom da je himerni protein kontinuirano aktivan, bez mogućnosti autoinhibicije (što se dešava kod normalnog proteina), ćelijska deoba se odigrava neprekidno, bez kontrole i vodi razvoju ALL (11).

Brojni faktori sredine su dovođeni u vezu sa nastankom ALL ali je samo za jonizujuće zračenje ta uzročnost i naučno potvrđena (12). U nekim ranijim istraživanjima pokazano je da izlaganje X-zračenju u toku intrauterinog razvića povećava rizik za nastanak ALL 1,5 put, dok je postnatalno izlaganje dijagnostičkim dozama X-zračenja povećavalo rizika za nastanak ALL kod devojčica ali ne i kod dečaka (13). Razvojem medicinske tehnologije i usavršavanjem aparata za radiološku dijagnostiku, značajno je smanjena doza zračenja koju pacijent dobije prilikom dijagnostičkih procedura, pa je verovatno ovaj rizik u savremenim uslovima nešto snižen. Terapijske doze X-zračenja su povezane sa povećanim rizikom za nastanak ALL i kod dečaka i devojčica (14).

Infekcije kao mogući okidač za nastanak ALL su opisane još davne 1917. godine (15). Njihova uloga u patogenezi leukemija se decenijama istraživala i do danas postoje dve teorije koje bi mogle da objasne mehanizme kojima infektivni agensi mogu biti okidači nastanka leukemija. Kinlenova hipoteza ili hipoteza mešanja populacija, pretpostavlja da ALL u dečjem uzrastu nastaje kada podložne individue bivaju izložene uobičajenim infekcijama. Migracija jedne populacije iz područja u kome je neki mikroorganizam sporadično prisutan u područje u kome je taj mikroorganizam veoma čest, dovodi do neuobičajenog odgovora na njega i nastanka ALL (16, 17). Ovoj teoriji ide u prilog i činjenica da je porast incidence ALL nakon migracije u novu sredinu, vremenski ograničen, što se objašnjava imunizacijom populacije na novi mikroorganizam. Druga teorija je Grivesova teorija odloženih infekcija koja se zasniva na već opisanom modelu dva događaja i sugeriše da se kod podložne osobe koja ima prenatalno razvijen preleukemijski klon i koja u ranom uzrastu nije imala kontakta sa uobičajenim infektivnim agensima (zbog “prezaštićenosti”) te je izostala uobičajena

stimulacija imunog sistema, u kasnijim godinama života razvija patološki odgovor na infektivne agense što predstavlja okidač početka klinički manifestne leukemije (9, 18).

1.1.3 Klinička slika ALL

Simptomi i znaci koji se javljaju kod bolesnika obolelog od ALL su posledica dva mehanizma. Prvi je neefektivna hematopoeza koja se javlja usled ekspanzije malignog klona u koštanoj srži i potiskivanja normalnog hematopoetskog tkiva bele, crvene i trombocitne loze. Ovo za posledicu ima smanjeno stvaranje eritrocita i pojavu anemije, smanjeno stvaranje trombocita i pojavu trombocitopenije i smanjeno stvaranje neutrofila i pojavu neutropenije. Anemija se manifestuje bledilom, malaksalošću, umorom, glavoboljom i oslabljenim apetitom. Trombocitopenija za posledicu ima pojavu krvarenja, koja su najčešće bezazlena i lokalizovana su u koži u vidu petehija ili hematoma, ali se veoma retko mogu javiti i životno ugrožavajuća krvarenja u unutrašnjim organima (CNS, bubrezi, pluća itd.). Neutropenija se manifestuje sklonošću ka nastanku infekcija. Drugi mehanizam nastanka simptoma i znakova ALL, je infiltracija drugih tkiva i organa malignim ćelijama. Na ovaj način dolazi do pojave bolova u zglobovima i kostima, pojave limfadenopatije, hepatomegalije ili splenomegalije kao i oštećenja drugih zahvaćenih organa. Retko se bolest može manifestovati oštećenjem bubrežne funkcije ili čak akutnom bubrežnom insuficijencijom, koje se češće viđaju u sklopu sindroma tumorske lize. Hiperleukocitoza može rezultovati pojavom leukostaze, što se retko dešava kod ALL a nešto je češća kod akutnih mijeloidnih leukemija, i oštećenjem pluća i CNS-a. Infiltracija CNS u vidu prisustva limfoblasta u cerebrospinalnoj tečnosti ili leukemijskih infiltrata u parenhimu mozga može biti prisutna u vreme postavljanja dijagnoze te se onda od simptoma i znakova bolesti mogu uočiti glavobolja, mučnina, povraćanje, razdražljivost, letargija, konvulzije, pareze/paralize kranijalnih nerava, edem papile očnog živca i drugi znaci povišenog intrakranijalnog pritiska. Kod dečaka se, retko, može uočiti infiltracija testisa.

1.1.4 Dijagnoza i klasifikacija ALL

Metode postavljanja tačne i precizne dijagnoze ALL su se tokom vremena menjale i usavršavale. Ne tako davno, morfološka svojstva leukemijskih ćelija su predstavljala osnovu za dijagnostikovanje i klasifikovanje ALL. Razvojem medicinske tehnologije, metoda imunofenotipizacije i porastom dostupnosti genetskih analiza, ove nove metode su postale standard za dijagnostikovanje i preciznu klasifikaciju leukemija. Morfološka klasifikacija, iako se koristi u opisanju mikroskopskih karakteristika leukoblasta, ne utiče na klasifikaciji i dalje lečenje dece obolele od ALL.

1.1.5 Morfološka klasifikacija

Morfološka klasifikacija se zasniva na karakteristikama leukoblasta koje su uočljive posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom nakon standardnog bojenja razmaza koštane srži. Dugo korišćena, FAB klasifikacija („French-American-British Cooperative Group“ - francusko-američko-britanska kooperativna grupa) svrstala je leukoblaste u jednu od tri kategorije L1, L2 ili L3. Morfološka klasifikacija pomaže u inicijalnom razlikovanju i opisanju nalaza pregleda koštane srži ali se definitivna dijagnoza ALL i njena precizna klasifikacija postiže primenom metode imunofenotipizacije.

1.1.6 Imunofenotipizacija

Imunofenotipizacija, primenom metode protočne citometrije, predstavlja zlatni standard za postavljanje dijagnoze i precizno definisanje ćelijske linije malignog klona. Ovom metodom se može precizno definisati kojoj fazi razvoja bele loze pripada maligni klon. Za stratifikaciju leukemija u grupe rizika i za dalju terapiju i prognozu najvažnije je precizirati da li se radi o B ćelijskoj prekursorskoj leukemiji, T ćelijskoj leukemiji ili o

zreloj B ćelijskoj leukemiji. Osnovni imunofenotipski markeri koji se koriste za dijagnostikovanje leukemijskih ćelija poreklom od B ćelijske linije su CD19, CD20, CD22, CD24, CD79a. Pro-B ćelijska ALL (EGIL B-I podtip) se definiše prisustvom bar dva od CD19, CD22 ili CD79a, bez prisustva drugih markera diferencijacije. Ukoliko leukoblasti ekspimiraju i CD10 onda govorimo o najčešćoj formi B ćelijske leukemije – „common“ B prekursorskoj ALL (EGIL B-II podtip). Detektovanje i citoplazmatskih teških lanaca je karakteristika pre-B ćelijske leukemije ((EGIL B-III podtip) a ekspimiranje površnih lakih lanaca imunoglobulina je karakteristika zrele B ćelijske leukemije (EGIL B-IV podtip). Limfoblasti kod T ćelijskih leukemija se karakterišu postojanjem CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 ali se zbog nespecifičnosti ovih markera definitivna dijagnoza T ćelijske ALL postavlja dokazivanjem membranske i citoplazmatske ekspresije CD3 markera. Podtipovi T ćelijske ALL se takođe mogu definisati i to tako pro-T ćelijski (EGIL T-I podtip) karakteriše ekspresija cCD3 i CD7; pre-T (EGIL T-II podtip) pozitivnost cCD3, CD7 i CD5/CD2; za kortikalnu T-ćelijsku ALL (EGIL T-III podtip) karakteristična je ekspresija cCD3, Cd1a, sCD3 a za zrelu T-ćelijsku ALL (EGIL T-IV podtip) pozitivnost membranskog i citoplazmatskog CD3 i negativnost CD1a (19).

1.1.7 Kariotip ALL

Klasična analiza kariotipa, iako relativno stara metoda, predstavlja obavezan dijagnostički postupak u inicijalnoj obradi deteta obolelog od ALL. Ova metoda omogućava detekciju svih numeričkih hromozomskih aberacija kao i onih strukturnih aberacija koje su dovoljno velike (preko 5 Mb). Prema važećim protokolima za lečenje ALL kod dece, najveći prognostički značaj ima postojanje hipoploidije, jer se bolesnici čiji maligni klon sadrži 44 ili manje hromozoma svrstavaju u grupu visokog rizika i njihova prognoza je najlošija. Pored hipoploidije, postojanje nekih strukturnih aberacija, kao što su t(9;22)(q34;q11) i t(4;11)(q21;q23) predstavljaju loše prognostičke faktore. Bolesnici

kod kojih se detekuje hiperdiploidija, naročito ona sa preko 51 hromozom, imaju najbolju prognozu, pod uslovom da nemaju neke druge faktore loše prognoze (1, 20).

1.1.8 Molekularna genetika ALL

Razvoj visoko senzitivnih i specifičnih metoda molekularne genetike kao što su RT-PCR i FISH metode, metode protočne citometrije i sekvenciranja naredne generacije (eng. next generation sequencing – NGS) omogućilo je identifikovanje mnogih genskih rearanžmana koji imaju značaja u stratifikaciji ALL. Detekcija određenih genskih rearanžmana kao što su $t(9;22)(q34;q11)$, $t(4;11)(q21;q23)$, $t(12;21)(p13;q22)$ i $t(8;14)(q24.1;q32)$ predstavlja obavezan dijagnostički postupak, podjednako važan kao i imunofenotipizacija jer obezbeđuje adekvatnu stratifikaciju bolesnika u grupe rizika i primenu adekvatne terapije. Pored ovoga, visoka senzitivnost RT-PCR metode je omogućila merenje minimalne rezidualne bolesti (eng. minimal residual disease – MRD) koja predstavlja procenu odgovora na terapiju u tačno definisanim vremenskim trenucima i omogućava dodatnu evaluaciju grupe rizika i eventualno restratifikovanje bolesnika u višu grupu rizika ukoliko je terapijski odgovor neadekvatan. MRD se zasniva na proceni preostalog broja limfoblasta određivanjem specifičnih genskih promena koje karakterišu maligni klon. Obzirom da je senzitivnost metode veoma visoka, moguća je detekcija limfoblasta čak i onda kada je postignuta morfološka remisija koja se procenjuje metodom svetlosne mikroskopije.

1.1.9 Procena grupe rizika

Značaj napredak u lečenju ALL je postignut zahvaljujući prepoznavanju bolesnika koji imaju veći rizik za nastanak recidiva bolesti i shodno tome potrebu za intenzivnijom terapijom. Svi savremeni protokoli za lečenje ALL se zasnivaju na

stratifikaciji rizika za nastanak recidiva i prilagođavanju terapije ovako definisanim grupama rizika. Tokom godina istraživanja i razvoja protokola identifikovani su najvažniji faktori koji utiču na rizik za nastanak relapsa i oni su uvršćeni u sheme za stratifikaciju.

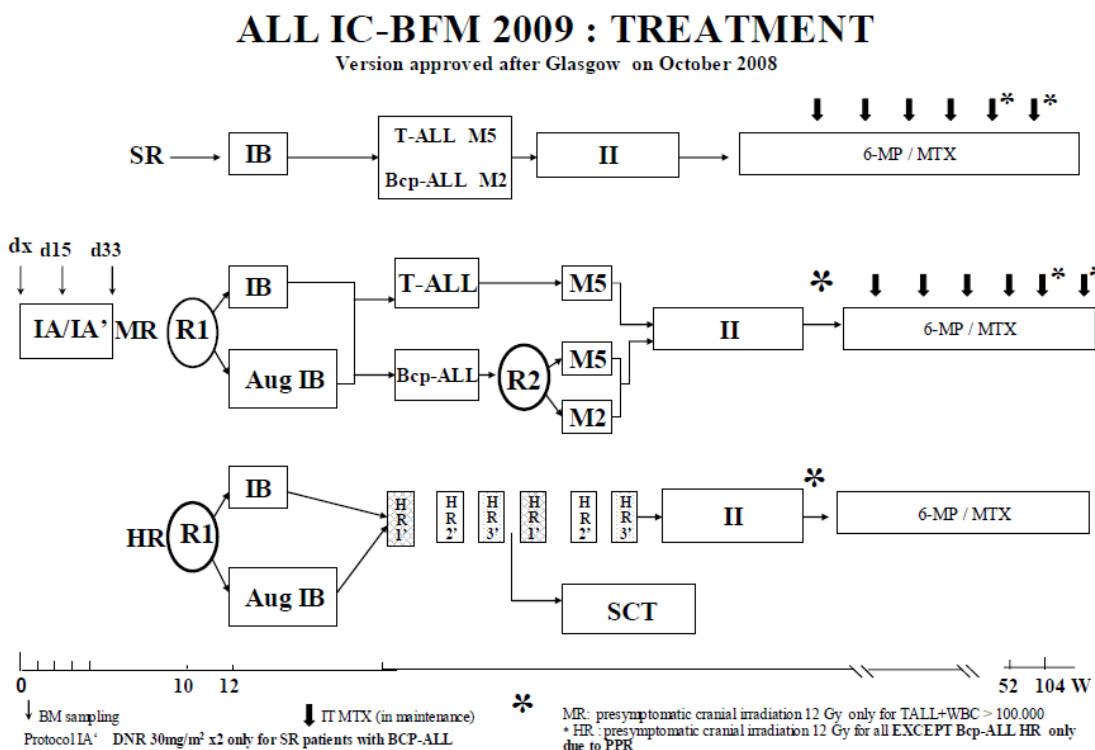
Uzrast bolesnika u vreme dijagnoze predstavlja nezavisni faktor rizika za uspešnost lečenja. Bolesnici uzrasta od jedne do šest godina se svrstavaju u standardnu (najnižu) grupu rizika i imaju bolji ishod lečenja od bolesnika drugih uzrasta. Odojčad imaju izrazito lošu prognozu, a naročito odojčad do šestog meseca života (21).

Broj leukocita u trenutku postavljanja dijagnoze takođe predstavlja značajan faktor rizika. Veći inicijalni broj leukocita korelira sa lošijim ishodom lečenja. Ovo se posebno odnosi na prekursorske B ćelijske leukemije, naročito ukoliko je taj broj veći od $20 \times 10^9/L$. U slučaju T ćelijskih leukemija, broj leukocita preko $100 \times 10^9/L$ je povezan sa većim rizikom za CNS recidiv (1).

Jedan od najvažnijih faktora rizika za stratifikaciju i ishod lečenja predstavlja odgovor na primenjenu terapiju. U različitim protokolima postoje varijacije u vremenskim trenucima kada se procenjuje odgovor na terapiju, ali je za sve protokole zajedničko da se procenjuje odgovor na kortikosteroidnu terapiju (prednizon) nakon sedam dana lečenja, procena minimalne rezidualne bolesti (u različitim vremenskim intervalima) i procena morfološke i molekularne remisije. Loš odgovor na terapiju po bilo kom od ova tri kriterijuma se smatra nezavisnim prognostičkim faktorom loše prognoze (1).

1.1.10 Terapija i prognoza ALL

Savremeno lečenje ALL u dečjem uzrastu podrazumeva primenu kombinovane hemioterapije u sklopu precizno definisanih terapijskih protokola. U poslednjih nekoliko decenija postignut je značajan napredak u lečenju ALL kod dece, zahvaljući optimalnoj upotrebi citostatika, preciznijoj stratifikaciji bolesnika i prilagođavanjem hemioterapijskih režima svakom bolesniku. Uspešnost lečenje dece obolele od ALL, primenom ovako dizajniranih protokola, je značajno povećana u odnosu na terapiju pre svega nekoliko decenija. Petogodišnje preživljavanje bez događaja (eng. event free survival – EFS) sada iznosi do 85% a ukupno preživljavanje čak do 90% (4). Uopšteno govoreći, terapija ALL se sprovodi kroz četiri faze. U daljem tekstu su detaljno objašnjene faze lečenja po aktuelnom ALL-IC BFM 2009 protokolu (slika 1) koji se primenjuje u Srbiji.



Slika 1. Shematski prikaz protokola ALL IC-BFM 2009 za lečenje ALL kod dece

Faza indukcije, predstavlja inicijalnu fazu u lečenju ALL. Lečenje se započinje primenom kortikosteroida (prednizon), a u daljem toku se primenjuju kombinacije vinkristina, daunorubicina, L-asparaginaze i intratekalno primenjenog metotreksata. Cilj ove faze je postizanje remisije bolesti koja se definiše kao prisustvo manje od 5% limfoblasta u koštanoj srži na kraju prvog dela faze indukcije tj. 33. dana lečenja.

Faza konsolidacije, predstavlja drugu fazu u lečenju ALL i usmerena je na učvršćivanje već postignute remisije bolesti i na sprečavanje razvoja CNS recidiva bolesti. Osnovu ove faze lečenja čini primena 6-merkaptopurina uz visoke doze metotreksata kao i intratekalnu primenu metotreksata, Ovo se odnosi prevashodno na bolesnike koji se nalaze u standardnoj ili srednjoj grupi rizika, dok se za bolesnike koji su svrstani u grupu visokog rizika faza konsolidacije razlikuje od gore navedene. Ona podrazumeva primenu terapijskih blokova u trajanju od pet do šest dana u toku kojih se primenjuje kombinovana hemioterapija visokim dozama metotreksata, ciklofosfamida, ifosfoamida, kortikosteroida (deksametazon), citarabina, L-asparaginaze, vinka alkaloida (vinkristina i vindesina), daunorubicina, etopozida i intratekalne primene „triple“ terapije (metotreksat, prednizolon i citarabin).

Faza reindukcije, predstavlja treću fazu lečenja ALL i veoma je slična fazi indukcije po izboru citostatika i režimu primene lekova. Lekovi koji se koriste u ovoj fazi su kortikosteroidi (deksametazon), vinkristin, doksorubicin, L-asparaginaza, citarabin, 5-tioguanina i intratekalna primene metotreksata.

Primena gore navedene tri faze lečenja traje između šest i osam meseci u zavisnosti od grupe rizika u koju je bolesnik svrstan kao i od broja i ozbiljnosti komplikacija u toku lečenja. Najveći broj lekova koji se koriste u ovim fazama primenjuje se parenteralno i potrebne su povremene hospitalizacije u cilju primene citostatika ili lečenja komplikacija. Kompletiranjem ovih faza lečenja, završava se period primene

intenzivne citostatske terapije i lečenje se dalje nastavlja primenom faze održavanja koja traje do ukupno dve godine od postavljanja dijagnoze i početka lečenja.

Faza održavanja, četvrta faza lečenja ALL ima za cilj sprečavanje recidiva leukemije. Tokom ove faze, primenjuju se oralna terapija svakodnevnom primenom 6-merkaptopurina i oralnom primenom metotreksata jednom nedeljno. U toku faze održavanja, se kod najvećeg broja bolesnika primenjuje i intrateklana terapija metotreksatom, osim kod onih bolesnika kod kojih je bila indikovana profilaktička ili terapijska radioterapija CNS-a.

1.2 FARMAKOGENOMIKA I FARMAKOGENETIKA

Farmakogenomika predstavlja nauku koja proučava varijabilnost ekspresije individualnih gena relevantnih za podložnost nastajanja određenog oboljenja i terapijski odgovor na određeni lek na svim nivoima (ćelijski, tkivni, individualni i populacioni). Farmakogenetika predstavlja izučavanje interindividualnih razlika DNK sekvence koje su povezane sa odgovorom na terapiju tj. određeni lek (22).

Poznavanje osnovnih farmakoloških principa je ključno za pravilnu primenu lekova u terapijske svrhe, kao i za pravovremeno prepoznavanje i razumevanje terapijskog efekta leka ili njegovog neželjenog dejstva. Dispozicija lekova je proces, koji podrazumeva nekoliko nadovezujućih koraka: resorpcija leka, distribucija leka unutar organizma, metabolizam i ekskrecija unetog leka i/ili njegovih metabolite (23). Resorpcija i distribucija leka dominantno su u funkciji farmakoloških svojstava samog preparata, hemijskih osobina i puta primene leka. Metabolizam leka je jedan od najvažnijih procesa od kojig zavisi efekat leka, dužina trajanja, jačina efekta i stepen ispoljavanja neželjenih efekata. Pojedini lekovi se u organizam unose u obliku proleka, a tek se nakon biotransformacije “aktiviraju” (nastajanjem aktivnih metabolita) i u tom obliku ostvaruju svoje farmakološko dejstvo. Mnogobrojni faktori mogu uticati na proces biotransformacije lekova kao što su pol, uzrast, postojanje pridruženih oboljenja (naročito hepatične ili bubrežne insuficijencije), faktori spoljašnje sredine (unos hrane, ekstremno niske ili visoke spoljašnje temperature) kao i genetski faktori. Zbog svega navedenog, uočeno je postojanje interindividualnih razlika u metabolizmu lekova koje se mogu značajno odraziti na efikasnost i bezbednost primene terapije (24). Antikancerski lekovi nisu pošteđeni ovih interindividualnih (25), a zbog ozbiljnih neželjenih efekata ovih lekova, još je nužnije dobro poznavanje svih faktora koji utiču na dispoziciju citostatika.

Farmakogenetskim istraživanjima došlo se do saznanja da genski polimorfizmi i mutacije u genima koji kodiraju proteine važne za metabolizam lekova mogu uticati na interindividualnu razliku u odgovoru na terapiju ili pojavu toksičnih efekata lečenja. Identifikacija ovih polimorfizama, omogućuje prepoznavanja bolesnika kod kojih će izostati očekivani terapijski efekat lekova ili će se razviti neočekivano izražena toksičnost, što nam daje mogućnost korigovanja terapijske doze ili terapijskog režima

(26). Ovo je naročito važno za lekove koji imaju uzak terapijski indeks (u ovu grupu se svrstava većina antikancerskih lekova) jer postoji mogućnost za subdoziranje bolesnika ili za razvoj ozbiljnih neželjenih događaja (27).

Interindividualne varijacije u aktivnosti enzima tiopurin S-metiltransferaze (TPMT) predstavljaju jedan od najboljih primera kliničke primene rezultata farmakogenetskih ispitivanja (28). Uloga enzima TPMT je da katalizuje S-metilaciju aromatičnih i heterocikličnih sulfhidrilnih jedinjenja u koja spadaju lekovi iz grupe tiopurina (6-merkaptopurin, 5-tioguanin i azatioprin). Weinshilbom i Sladek su još 1980. godine dokazali da se kod bolesnika koji imaju smanjenu aktivnost enzima TPMT mogu razviti izraženi mijelotoksični efekti pri primeni uobičajenih doza lekova iz grupe tiopurina. Očekivano, kod bolesnika kod kojih postoji povišena aktivnost enzima TPMT, uobičajene doze lekova nisu dovoljne za ispoljavanje terapijskog efekta (28).

Primena farmakogenetike i farmakogenomike u lečenju malignih bolesti mora da ima u obziru postojanje dva odvojena genoma, jedan je genom maligno alterisane ćelije a drugi je genom normalnih ćelija bolesnika. Efikasnost antikancerskih lekova će najviše zavisiti od genoma maligne ćelije, stoga je identifikovanje potencijalno značajnih polimorfizama u ovim ćelijama od izuzetnog značaja za modifikovanje terapije u cilju postizanja najveće efikasnosti (29). Sa druge strane, polimorfizmi u normalnim ćelijama bolesnika mogu imati uticaj na metabolizam antikancerskih lekova i tako doprineti varijabilnosti u ispoljavanju toksičnih efekata terapije (29).

1.3 TIOPURINSKI LEKOVI

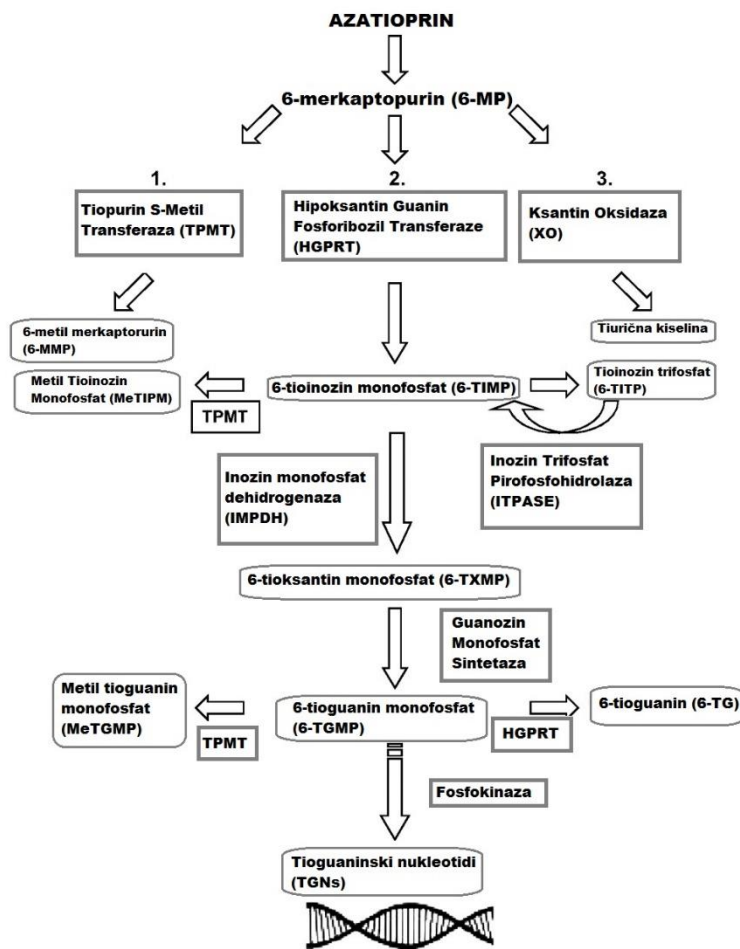
Tiopurinski lekovi su lekovi iz grupe antimetabolita ili strukturnih analoga. Osnovni mehanizam delovanja lekova iz ove grupe je da se oni, zbog strukturne sličnosti sa prirodnim metabolitima, inkorporiraju u metaboličke procese ćelije i zaustavljaju ih (30). Antimetaboliti najčešće deluju na metaboličke puteve koji uključuju sintezu nukleotida i nukleinskih kiselina. Činjenica da se maligne ćelije ubrzano dele i da je sinteza nukleinskih kiselina ubrzana, je iskorišćena da se ovi lekovi mogu uspešno primeniti u terapiji malignih bolesti. Prekidanjem sinteze nukleinskih kiselina, antimetaboliti zaustavljaju dalje umnožavanje malignih ćelija (31).

Antagonisti purinskih baza, 6-merkaptopurin (6-MP), 6-tioguanin (6-TG) i azatioprin (AZA) su, pored metotreksata, najčešće primenjivani lekovi iz grupe antimetabolita. Indikaciono područje za primenu tiopurina obuhvata inflamatorne bolesti creva, autoimune bolesti (autoimuni hepatitis, teške forme atopijskog ekcema), reumatske bolesti (sistemski lupus eritematodes, reumatski artritis), teške forme psorijaze, hematološke maligne bolesti, terapiju prevencije odbacivanja grafta nakon transplantacije solidnih organa (32). Azatioprin je lek koji se uglavnom primenjuje za lečenje inflamatornih i autoimunih stanja a 6-MP i 6-TG za lečenje hematoloških malignih bolesti.

1.3.1 Mehanizam dejstva i metabolizam tiopurina

Sva tri leka (AZA, 6-MP i 6-TG) su prolekovi koji tek nakon biotransformacije u organizmu, daju farmakološki aktivne metabolite. Aktivni metaboliti tiopurina su: 6-tioguanozin monofosfat, 6-tioguanozin difosfat i 6-tioguanozintrifosfat (TGMP, TGDP i TGTP). Ova tri jedinjenja se zajedničkim imenom nazivaju tioguaninski nukletidi (6-TGN) (33). 6-TGN inkorporacijom u molekul DNK dovode do prekida ćelijskog ciklusa i apoptoze ćelije, pod uslovom da su očuvani mehanizmi reparacije DNK (34, 35).

Azatioprin se najpre, nakon brze apsorpcije, neenzimskom transformacijom prevodi u 6-MP, a dalji metabolizam se odvija jednim od tri metabolička puta koji su veoma slični za 6-MP i za 6-TG (slika 2). Da bi ispoljili svoj citostatski efekat, tiopurini moraju da prođu enzimsku aktivaciju uz pomoć enzima hipoksantin guanin fosforibozil transferaze (HGPRT). 6-TG se enzimskom aktivacijom uz pomoć HGPRT direktno prevodi u farmakološki aktivan TGMP (34). Metabolizam 6-MP je nešto kompleksniji jer se on nakon dejstva HGPRT, preko dva neaktivna metabolita (6-tioinozin monofosfata, 6-tioksantin monofosfata) i uz pomoć nekoliko enzima (inozin monofosfat dehidrogenaze, guanozin monofosfat sintetaze i fosfokinaze) pretvara u aktivni TGMP, koji onda ispoljava svoj citotoksični efekat ili se dalje transformiše u druge forme farmakološki aktivne metabolite (6-TGN). U prvom delu metaboličkog puta, koji je karakterističan samo za 6-MP, kao jedan od intermedijernih metabolita nastaje 6-tiozin monofosfat (6-TIMP) koji može dalje nastaviti biotransformaciju ka 6-TGN ili pak ući u dve druge reakcije: U prvoj reakciji se, uz pomoć enzima TPMT, konvertuje u metil tioinozin monofosfat (MeTIMP), za koji se smatra da malim delom doprinosi citotoksičnosti tiopurina snažnom inhibicijom *de novo* sinteze purina (36). Druga mogućnost je da se 6-TIMP fosforiliše u 6-tioinozin trifosfat (6-TITP). 6-TITP je takođe aktivan metabolit ali se povratnom reakcijom koju katališe enzim inozin trifosfat pirofosfataza (ITPA) ponovo transformiše u 6-TIMP koji dalje može ići u pravcu 6-TGN ili MeTIMP.

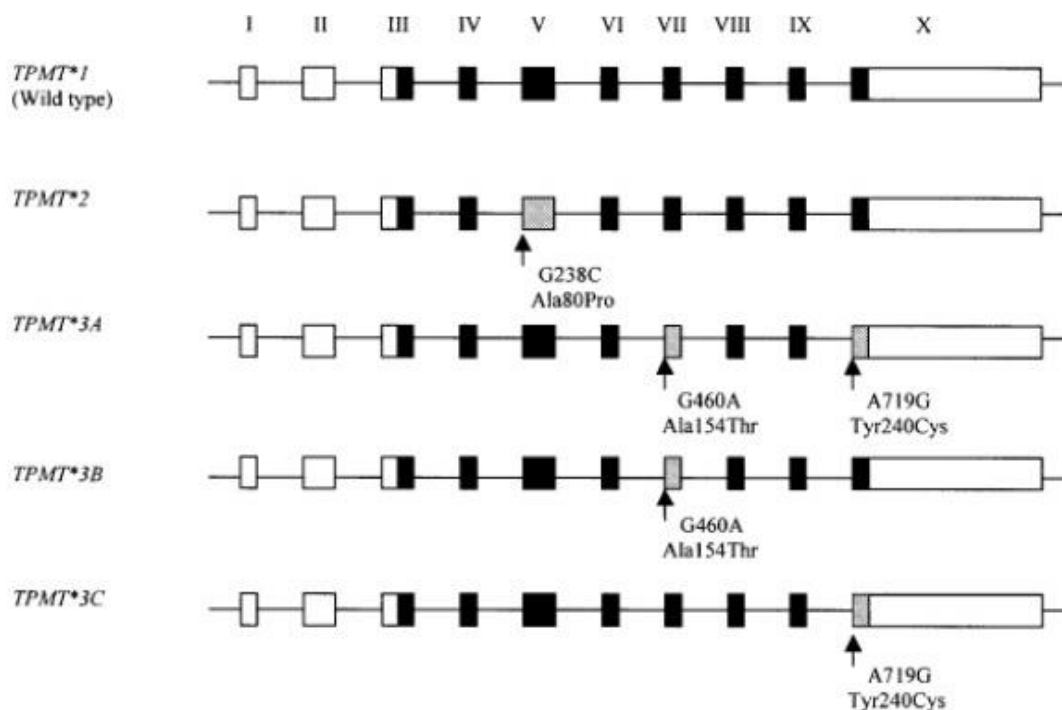


Slika 2. Shematski prikaz metabolizma AZA i 6-MP
 (preuzeto i prilagodjeno iz: Ford LT, Berg JD Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come *Journal of Clinical Pathology* 2010;63:288-295.)

Inaktivacija tiopurinskih lekova se može odigrati preko dva metabolička puta. Prvi uključuje biotransformaciju uz pomoć enzima TPMT kada nastaje 6-metil-merkaptopurin (6-MMP) koji je neaktivan metabolit. Drugi metabolički put je biotransformacija 6-MP uz pomoć enzima ksantin oksidaze (XO) gde kao krajnji produkt nastaje tiurična kiselina koja je takođe neaktivan metabolit. Obzirom da je ekspresija XO u hematopoetskim ćelijama minimalna, glavni metabolički put inaktivacije tiopurina je preko enzima TPMT. Merenje koncentracije aktivnih metabolita tiopurina (6-TGN) u eritrocitima je pokazalo da postoji obrnuto proporcionalni odnos između aktivnosti TPMT enzima i koncentracije 6-TGN u ovim ćelijama (37, 38).

1.3.2 Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT)

Polimorfizmi u genima koji kodiraju proteine uključene u metabolizam 6-MP mogu da utiču na efikasnost i toksičnost leka (39). TPMT predstavlja važan enzim za inaktivaciju tiopurinskih lekova (Slika 5), i dokazano je da osobe koje su nosioci dva neaktivna TPMT alela (homozigotna TPMT deficijencija) imaju izuzetno izraženu mijelotoksičnost kada se leče konvencionalnim dozama tiopurinskih lekova. Heterozigotna deficijencija TPMT-a (postojanje jednog neaktivnog TPMT alela) dovodi do razvoja umerene do teške mijelotoksičnosti, nasuprot homozigotnim nosiocima *wild-type TPMT* alela (TPMT*1) koji imaju niži rizik za razvoj mijelotoksičnosti u toku primene konvencionalnih doza 6-MP (40, 41). Gen za TPMT (veličine 27 kb) se nalazi na kratkom kraku hromozoma 6 (6p22.3) i kodira protein veličine 28 kDa. Protein je izgrađen od 10 egzona, od kojih njih osam kodiraju TPMT protein (Slika 3).

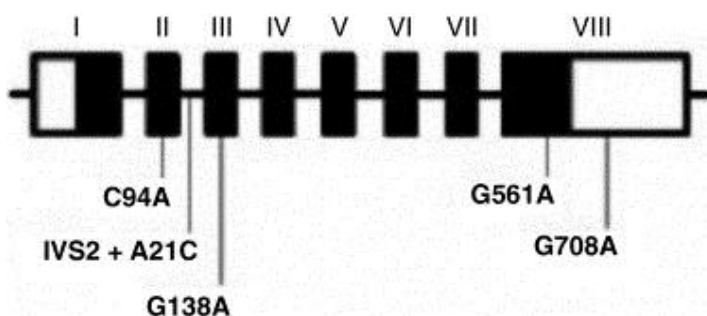


Slika 3. Shematski prikaz najčešćih varijanti TPMT gena

1.3.3 Inozin trifosfat pirofosfataza (ITPA)

Pokazano je da polimorfizmi u genu za inozin trifosfat pirofosfatazu (*ITPA*), koja moduliše aktivnost inozin trifosfat pirofosfataze, mogu uticati na akumulaciju toksičnih tiopurinskih metabolita (Slika 5). Na taj način su, nosioci polimorfizama koji smanjuju aktivnost inozin trifosfat pirofosfataze, skloni razvoju teške mijelosupresije tokom primene konvencionalnih doza 6-MP (42-44).

ITPA gen je lociran na hromozomu 20p i ima 8 egzona. Do sada je izolovano pet polimorfizama (Slika 4). Tri od ovih pet su neme mutacije (138G→A, 561G→A, 708G→A) dok se dve mutacije (94C→A i IVS2+21A→C) dovode u vezu sa smanjenom aktivnošću ITPase.



Slika 4. Shematski prikaz najčešćih varijanti *ITPA* gena

Pokazano je da homozigoti za missens mutaciju 94C→A (Pro32 to Thr) nisu imali nikakvu aktivnost enzima ITPase u eritrocitima, dok su heterozigoti za istu mutaciju imali 22,5% aktivnosti enzima. Homozigoti za IVS2+21A→C mutaciju su imali oko 60% aktivnosti enzima u eritrocitima dok je kod heterozigota za ovu mutaciju aktivnost enzima bila blizu 100%. U svim slučajevima smanjenje aktivnosti ITPase, bila je prisutna jedna ili obe mutacije (45).

Kod bolesnika koji boluju od inflamatornih bolesti creva, kod kojih je u terapiji primenjivan azatioprin, primećena je značajna povezanost između neželjenih efekata terapije i mutacije 94C→A. Većina pacijenata koji su imali ovu mutaciju su bili heterozigoti sa prosečnom aktivnošću enzima oko 25%. Nasuprot ovome, povezanost

mutacije IVS2+21A→C i neželjenih efekata terapije nije zabeležena. Kod heterozigota za IVS2+21A→C aktivnost enzima je bila u normalnim granicama a kod homozigota je iznosila oko 60%. Obzirom da nisu postojali neželjeni efekti, zaključeno je da je ovaj nivo enzimske aktivnosti dovoljan da spreči akumulaciju 6-TITP i njegove toksične efekte (46)

Krishnamurthy i saradnici (2008) su pokazali da prisustvo mutacije 94C→A značajno utiče na metabolizam 6-MP i povećanje toksičnosti (manifestovane kao febrilna neutropenija) kod onih bolesnika kod kojih je terapija 6-MP bila individualizovana na osnovu TPMT genotipa. Kod onih pacijenta kod kojih nije postojala individualizacija terapije na osnovu TPMT genotipa pokazano je da nema povezanosti između povećane toksičnosti i ITPA genotipa, već da je genotip TPMT dominantan pokazatelj metabolizma merkaptopurina i toksičnosti. Iz ovoga se zaključuje da, ukoliko se doziranje 6-MP prilagodi genotipu TPMT, onda se ispoljava uticaj genotipa ITPA na toksičnost (47).

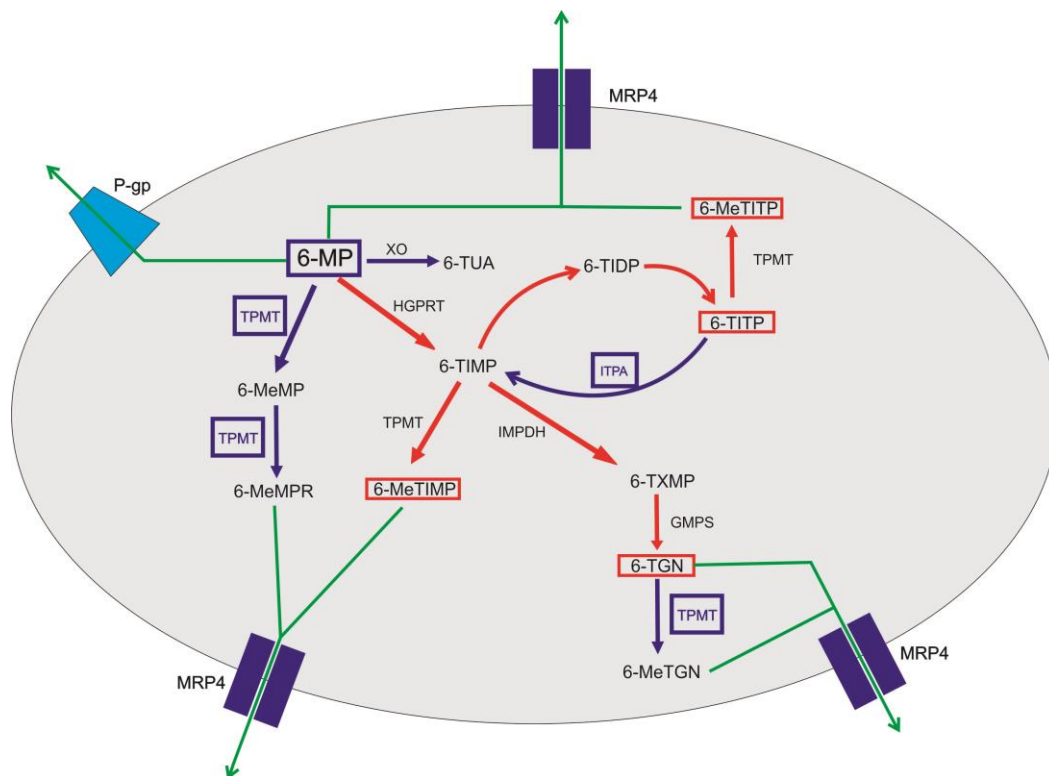
1.3.4 Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4)

The Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4) je protein iz familije ATP-binding cassette transporters (ABC-transporter) protein i eksprimiran je u raznim ćelijama ljudskog organizma (endotel kapilara, hepatociti, ćelije proksimalnih tubula bubrega, enterociti i ćelije krvi sa naročito velikom ekspresijom u prostati i hematopoetskim ćelijama). MRP4 je ATP zavisan transmembranski transporter za organske anjone i primarna uloga mu je efluks štetnih jedinjenja iz ćelije, kako endogeno stvorenih materija tako i ksenobiotika. Fiziološka uloga MRP4 proteina je detoksifikacija od lekova i drugih toksičnih molekula (42). MRP4 protein je, između ostalog, efluks pumpa za metilovane 6-MP nukletide, čime ispoljava svoju protektivnu ulogu i štiti ćelije od toksičnog efekta metilovanih 6-MP nukleotida (Slika 5). Gen koji kodira MRP4 je *ABCC4* (ATP-binding cassette sub-family C member 4) gen, i veoma je polimorfan, sa više od 20 missense pomimorfizama. Manje funkcionalni *ABCC4* aleli mogu biti odgovorni za izraženiju mijelosupresiju tokom terapije 6-MP. Sa druge strane, nešto aktivniji *ABCC4* aleli mogu

biti odgovorni za rezistenciju na 6-MP (47). Od strane Lopeza i saradnika, u velikoj GWAS studiji je identifikovan nucleotid T in *ABCC4* c.*1372 T>G, kao genska varijanta koja rezultira smanjenom ekspresijom *ABCC4* gena i samim tim, povećanom 6-MP indukovanom toksičnošću (48).

1.3.5 P-glikoprotein

The ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1) gen kodira protein P-glikoprotein. P-glikoprotein je ATP zavisna transmembranska efluks pumpa koja transportuje ksenobiotike van ćelije, ali i sprečava ulazak toksičnih materija u ćeliju (49). Pokazano je da neke tumorske ćelije, tumora koji su rezistentni na primenu citostatika, imaju značajno povišenu ekspresiju *ABCB1* gena. U više od polovine bolesnika koji su imali recidiv akutne mijeloidne leukemije (AML), P-glikoprotein je imao povišenu aktivnost u odnosu na bolesnike koji nisu imali recidiv bolesti. Ovaj podatak, čini P-glikoprotein pogodnim kandidatom za faktor loše prognoze u lečenju AML. P-glikoprotein ima ulogu efluks pumpe za razne lekove koji se koriste u lečenju dece obolele od ALL, kao što su doksorubicin, etopozid, vinkristin i 6-MP (Slika 5) (50). Povišena ekspresija *ABCB1* gena može biti odgovorna za neuspeh terapije ili recidiv bolesti (51), dok snižena aktivnost P-glikoproteina može voditi teškoj mijelotoksičnosti izazvanom primenom nekog od ovih lekova.



Slika 5. Metabolizam 6-MP u odnosu na ispitivane gene

Plave linije predstavljaju inaktivacione puteve; crvene linije predstavljaju puteve koj stvaraju aktivne metabolite; zelene linije predstavljaju eliminaciju (efluks) iz ćelije. 6-MP: 6-mercaptopurin, XO: ksantin oksidaza, 6-TUA: 6-tiourična kiselina, TPMT: tiopurin S-metiltransferaza, 6-MeMP: 6-metilmerkaptopurine, 6-MeMPR: 6-metilmerkaptopurine ribonukleotid, HGPRT: hipoksantin fosforibozil transferaza, 6-TIMP: 6-tioinozin 5'-monofosfat, 6-TIDP: 6-tioinozin 5'-difosfat, 6-TITP: 6-tioinozin 5'-trifosfat, 6-MeTITP: 6-metilthioinosine 5'-trifosfat, ITPA: inozin trifosfat pirofosfataza, 6-MeTIMP: 6-metilthioinozin 5'-monofosfat, IMPDH: inozin monofosfat dehidrogenaza, 6-TXMP: 6-tioksantin 5'-monofosfat, GMPS: guanozin monofosfat sintetaza, 6-TGN: 6-tioguanin nukleotid, 6-MeTGN: 6-metilthioguanin nukleotid, MRP4: multidrug resistance protein 4, P-gp: P-glikoprotein.

2 CILJEVI

1. Utvrđivane učestalosti genetičkih varijanti u genima *TMPT*, *ITPA*, *MRP4* i *ABCB1* u populaciji dece obolele od akutne limfoblastne leukemije u Srbiji.
2. Utvrđivanje korelacije prisutnih genetičkih varijanti u genima *TMPT*, *ITPA*, *MRP4* i *ABCB1* na ispoljenu mijelotoksičnost kod bolesnika koji se leče od akutne limfoblastne leukemije tokom terapije održavanja.
3. Utvrđivanje uticaja istovremene udruženosti genetičkih varijanti u genima *TPMT*, *ITPA*, *MRP4* i *ABCB1* na ispoljenu mijelotoksičnost kod bolesnika koji se leče od akutne limfoblastne leukemije tokom terapije održavanja.
4. Utvrđivanje uticaja prisutnosti genetičkih varijanti u genima *TMPT*, *ITPA*, *MRP4* i *ABCB1* na ishod lečenja dece obolele od ALL.

3 MATERIJAL I METODE

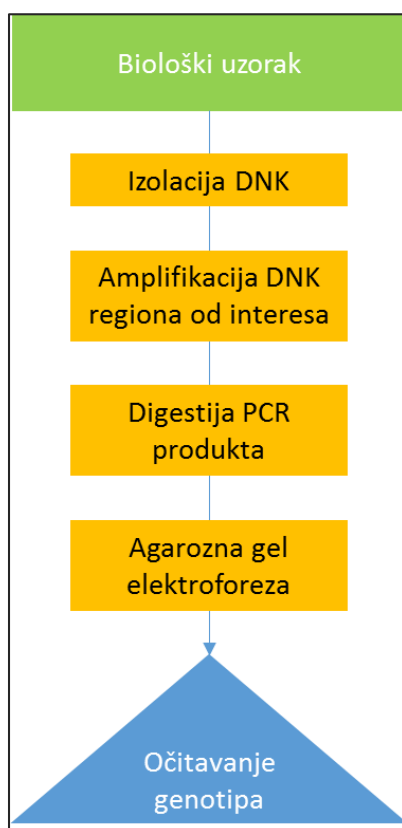
3.1 ISPITANICI

U ovu studiju je bilo uključeno 68 dece koja su dijagnostikovana i lečena u Službi za hematologiju i onkologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, u periodu od januara 2003. godine do januara 2013. godine. Roditelji ili staratelji bolesnika su potpisali pristanak informisanog pacijenta u učesće u studiji. Studija je odobrena od strane Etičkog odbora Univerzitetske dečje klinike i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Lečenje dece je sprovedeno primenom odgovarajućih protokola ALL IC-BFM 2002 ili ALL IC-BFM 2009 u zavisnosti kada je postavljena dijagnoza. Bolesnici dijagnostikovani pre 1.4.2010. godine su lečeni primenom ALL IC-BFM 2002 protokola a oni koji su dijagnostikovani nakon tog datuma, primenom ALL IC-BFM 2009 protokola, koji je i sada u primeni (52). Bolesnici su klasifikovani u grupe rizika na osnovu rizika za nastanak recidiva bolesti (grupa standardnog rizika – SR, grupa medijarnog rizika – IR i grupa visokog rizika – HR) u skladu sa aktuelnim protokolom. Svi bolesnici su dobijali terapiju održavanja koja se sastojala od oralne primene 6-MP, jednom dnevno u dozi u 50 mg/m^2 i oralne primene metotreksata jednom nedeljno u dozi od 20 mg/m^2 . Faza održavanja je trajala između 13 i 17 meseci (60-77 nedelja) u zavisnosti od trajanja prethodnih faza lečenja i broja i dužine komplikacija. Željena leukopenija kod bolesnika u fazi održavanja je bila između $2,0 \times 10^9/\text{L}$ i $3,0 \times 10^9/\text{L}$. Željena leukopenija je održavana redovnim kontrolama krvne slike na svake dve nedelje tokom čitave terapije održavanja i eventualnim korekcijama doze lekova u skladu sa brojem leukocita. Ako bi broj leukocita pao ispod $2,0 \times 10^9/\text{L}$, doza 6-MP je smanjivana za 25%, a ako bi broj leukocita bio iznad $3,0 \times 10^9/\text{L}$, doza 6-MP je povećavana za 25%. Ako bi broj leukocita pao ispod $1,0 \times 10^9/\text{L}$, terapija 6-MP je prekidana do oporavka broja leukocita. *TPMT* genotip je određivan svim pacijentima pre započinjanja terapije održavanja i doza 6-MP je korigovana shodno genotipu i preporukama (41, 53). Toksičnost i neželjeni događaji tokom terapije 6-MP u fazi

održavanja su praćeni koristeći surogat markere (broj nedelja bez terapije, broj epizoda leukopenije, prosečna doza 6-MP – koja je računata tako da je 50 mg/m² smatrano za 100% doze). Neželjeni efekti, kao što je hepatotoksićnost (porast transaminaza, stratifikovana prema CTCAE kriterijumima), osip, akutni pancreatitis i simptomi slični gripu su beleženi za sve bolesnike na redovnim kontrolama.

3.2 DETEKCIJA GENETIĆKIH VARIJANTI

Detekcija genetićkih varijanti od interesa za ovo istraživanje je detaljno opisana u pređašnjem radu (54), dok je u nastavku teksta dat kratak opis korišćenih metoda, kao i shematski prikaz plana rada (Slika 6) (55, 56).



Slika 6. Shematski prikaz detekcije genetićkih varijanti

Za detekciju genetićkih varijanti je korišćena metoda lanćane reakcije polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) praćena analizom polimorfizma dućine

restrikcionih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Kao matrica za PCR reakciju je korišćena prečišćena DNK ALL pacijenata i zdravih ispitanika. DNK je izolovana iz uzoraka krvi, koštane srži, bukalnog brisa ili krvnih razmaza koristeći *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) ili metodom isoljavanja. Čistoća DNK je proverena spektrofotometrijski, nakon čega su uzorci čuvani na -20°C do dalje upotrebe.

Proučavano je ukupno 5 varijanti u 4 gena: *TPMT* c.460 G>A, *TPMT* c.719 A>G, *ITPA* c.94 C>A, *ABCC4* c.*1372 T>G i *ABCB1* 2677 G>T. PCR metodom je amplifikovan region DNK koji okružuje varijantu od interesa. Prinos i specifičnost PCR reakcije su proveravani elektroforezom na agaroznom gelu. Produkt PCR reakcije je podvrgnut digestiji specifičnim restrikcionim enzimom koji je izabran tako da prepozna DNK sekvencu u okolini varijabilnog mesta u zavisnosti od toga da li je varijanta od interesa prisutna ili nije. Produkti digestije su analizirani elektroforezom na agaroznom gelu i genotip svakog ispitanika je direktno očitavan na osnovu rasporeda traka vidljivih pod UV svetlom.

3.3 STATISTIČKA ANALIZA

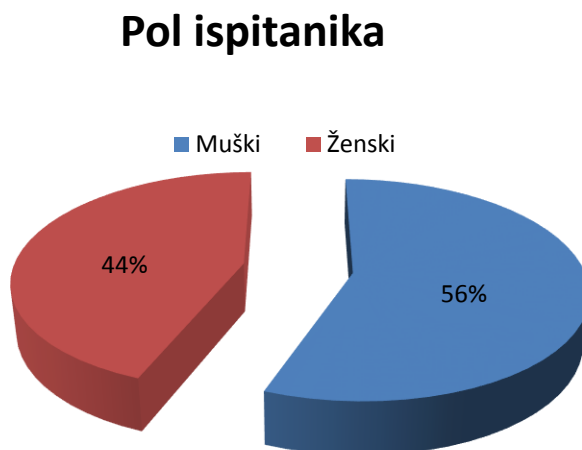
Za ispitivanje povezanosti posmatranih genotipa i toksičnosti, korišćeni su Mann-Whitney test, Student t-test, Kruskal-Wallis test i ANOVA. U cilju predviđanja 6-MP indukovane toksičnosti kod bolesnika sa ALL, na osnovu genotipa *TPMT*, *ITPA*, *ABCB1* i *ABCC4*, dizajniran je probabilistički model koristeći Elastic net, Neural net i Random forest machine learning algoritme. Ovi modeli su korišćeni da identifikuju bolesnike kod kojih je prosečna doza 6-MP bila ispod proseka (loša tolerancija terapije 6-MP) ili iznad proseka (dobra tolerancija terapije 6-MP). Primenjena je ponavljana desetostruka ukrštena validacija. Vrednosti površine ispod ROC krive (AUC) su korišćene da se proceni performansa klasifikacionih modela. AUC vrednosti su bile u rasponu od 0,5 (slučajna klasifikacija) do 1,0 (savršena

klasifikacija) (57). Softverski program R (v.3.4.3) je korišćen za primenu prediktivnih algoritama i merenje njihovih performansi, koristeći sledeće statističke pakete: glmnet (58), nnet (59), randomForest (60), ROCR (61), PresenceAbsence (62).

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

U studiji je učestvovalo 68 bolesnika. Prosečni uzrast u vreme postavljanja dijagnoze je bio 5,2 godine. Najmlađi bolesnik je imao 11 meseci a najstariji 17,6 godina. Uočena je nešto veća zastupljenost dečaka u odnosu na devojčice (Grafikon 1).



Grafikon 1. Pol ispitanika

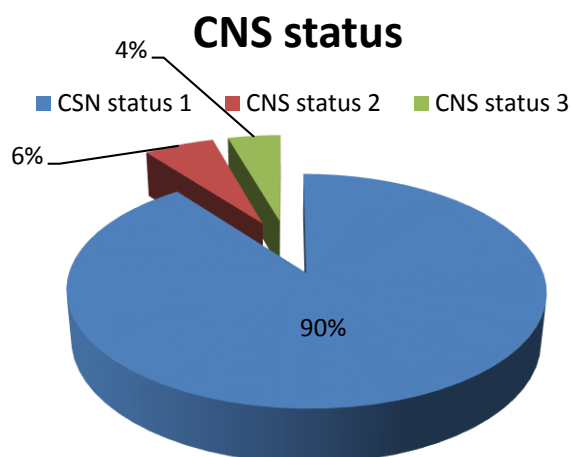
Opšte karakteristike bolesnika su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Karakteristike bolesnika

(N°=68 bolesnika)		
Uzrast	Godine	
Prosek	6.5	
Medijana	5.2	
Opseg	0.9 – 17.6	
Pol	N°	%
Muški	38	56
Ženski	30	44
Imunofenotip		
B ćelijska	58	85
T ćelijska	10	15
Molekularna genetika		
Negativna	47	69
BCR/ABL	3	4
MLL/AF4	2	3
TEL/AML1	14	21
E2A/PBX1	2	3
Primenjeni protocol		
ALL IC BFM 2002	39	57
ALL IC BFM 2009	29	43
Terapijski odgovor na pronizon		
Dobar odgovor	61	90
Loš odgovor	7	10
Mijelogram 33. dana		
M1	67	98
M2	0	0
M3	1	2
Grupa rizika		
Standardni rizik	11	16
Srednji rizik	47	69
Visoki rizik	10	15
Ishod		
Remisija bolesti	59	87
Recidiv bolesti	5	7
Smrt u relapsu	4	6

M1 – broj leukoblasta <5%; M2 – broj leukoblasta 5-25%; M3 – broj leukoblasta >25%.

Pregledom likvora kod svih bolesnika pre započinjanja terapije, uočeno je da najveći broj dece (njih 61) nema proširenost leukemije na centralni nervni sistem, dok je kod svega tri bolesnika dokazano prisustvo leukoblasta u likvoru. Kod četiri bolesnika, zbog traumatske lumbalne punkcije i posledičnog prisustva krvi u likvoru, CNS status je po protokolu definisan kao CNS status 2 (Grafikon 2).

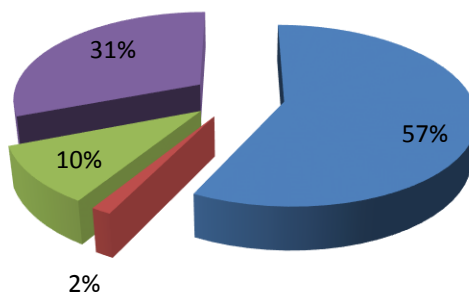


Grafikon 2. CNS status na početku bolesti

Analizom kariotipa koštane srži koji predstavlja značajan faktor za procenu rizika za nastanak recidiva bolesti, uočeno je da najveći broj bolesnika ima normalan kariotip (39 bolesnika), dok je hipodiploidija kao faktor loše prognoze bila prisutna kod samo jednog bolesnika (Grafikon 3). Kod jedne trećine bolesnika nije bilo moguće odrediti kariotip zbog nedostatka mitozu u uzorku koštane srži.

Kariotip

■ Normalan broj hromozoma ■ Hipodiploidija
■ Hiperdiploidija ■ Nema mitozu

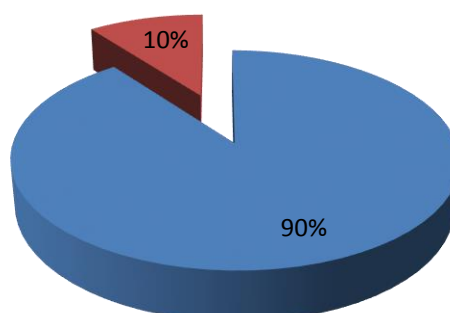


Grafikon 3. Kariotip koštane srži.

Procena odgovora na terapiju osmog i 15. dana lečenja su prikazani na grafikonima 4 i 5. Kod najvećeg broja bolesnika, mijelogram 15. dana je pokazao postojanje morfološke remisije (84%), dok je kod samo jednog bolesnika u koštanoj srži postajao broj blasta veći od 25%.

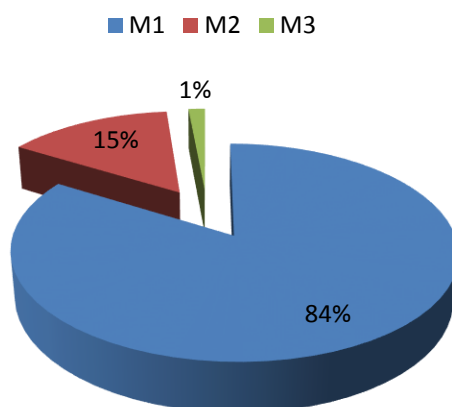
Odgovor na pronizon 8. dana terapije

■ Dobar odgovor ■ Loš odgovor



Grafikon 4. Odgovor na pronizon 8. dana terapije

Mijelogram 15. dan



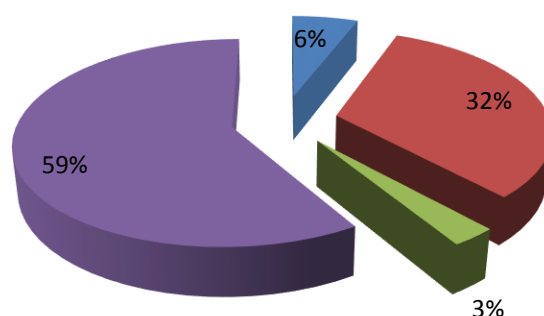
Grafikon 5. Odgovor na terapiju 15. dana lečenja

M1 – broj leukoblasta <5%; M2 – broj leukoblasta 5-25%; M3 – broj leukoblasta >25%.

Istovremeno sa procenom morfološke remisije u koštanoj srži 15. dana lečenja, iz istog uzorka određenom broju bolesnika (28 bolesnika) je rađena i analiza MRD koja je pokazala da najveći broj bolesnika pripada grupi srednjeg rizika na osnovu MRD analize, pod uslovim da ih drugi faktori rizika ne svrstavaju u grupu visokog rizika. Kod svega dva bolesnika, MRD analiza ih je svrstala u grupu visokog rizika zbog visoke vrednosti MRD (Grafikon 6). Analiza nije rađena kod 40 bolesnika koji su lečeni u skladu sa protokolom ALL IC BFM 2002, u kome MRD nije korišćen za procenu odgovora na terapiju.

MRD 15. dan

■ <0,01 ■ 0,01-10 ■ >10 ■ nije rađena analiza



Grafikon 6. Minimalna rezidualna bolest 15. dana

Prosečno vreme i medijana trajanja terapije održavanja su bili 16 meseci, u opsegu od devet do 16 meseci. Prosečna doza 6-MP u toku terapije održavanja za sve bolesnike je bila 101%, dok je medijana iznosila 100%. Najniža primenjena doza 6-MP je bila 34%, dok je najviša primenjena doza iznosila 197%. Deset bolesnika sa ALL (15% ukupnog broja bolesnika) provelo je više od 10% ukupnog trajanja terapije održavanja bez terapije zbog leukopenije. Samo 21 bolesnik (30.5%) nije imao ni jednu epizodu leukopenije u toku terapije održavanja. Preostalih 47 bolesnika su imali bar jednu epizodu leukopenije. Hepatotoksičnost različitog stepena je uočena u 45 bolesnika (66%) u nekom trenutku u toku terapije održavanja.

4.2 TPMT

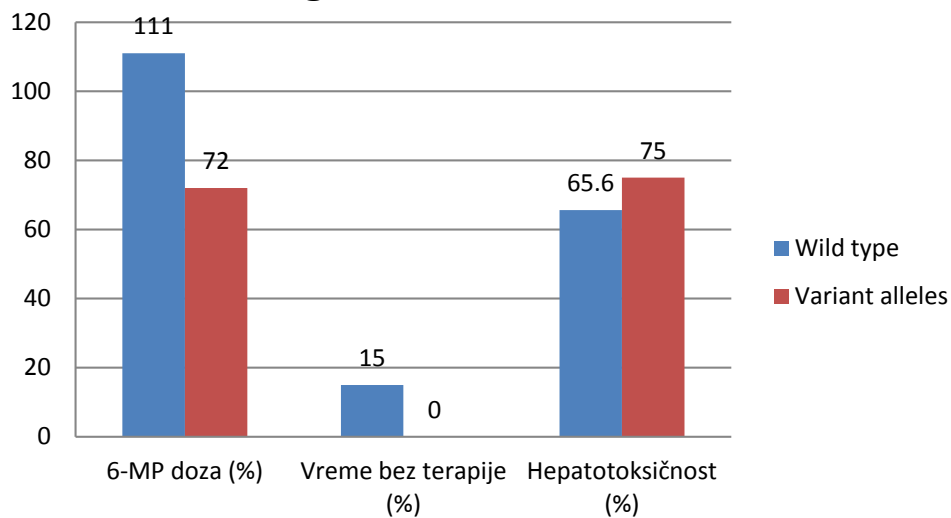
Učestalost polimorfizama u *TPMT* genu su prikazane u tabeli 2.

Tabela 2. Učestalost *TPMT* polimorfizama

		Broj	%	Broj	%
<i>TPMT</i> wild type	<i>TPMT</i> *1/ <i>TPMT</i> *1	64	94,2	64	94,2
<i>TPMT</i> varijanta	<i>TPMT</i> *3A	3	4,3	4	5,8
	<i>TPMT</i> *3C	1	1,5		

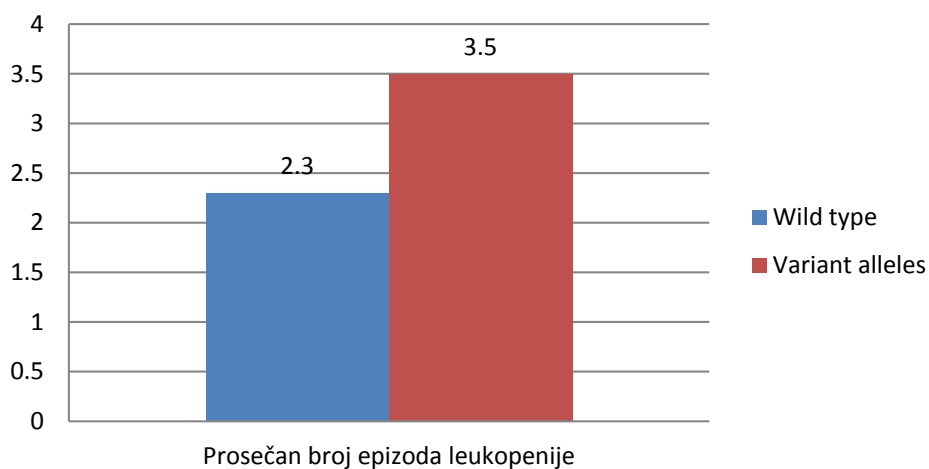
Prosečna doza 6-MP u grupi bolesnika sa ALL koji su bili nosioci bar jednog *TPMT* varijantnog alela (c.460A ili c.719G) je iznosila 72%, nasuprot prosečne doze kod bolesnika koji su bili nosioci *wild type* alela kod kojih je iznosila 111%, što predstavlja statistički značajnu razliku ($p=0,003$). U grupi bolesnika koji su bili *TPMT* pozitivni (nosioci varijantnih alela) nije bilo pacijenata koji su proveli više od 10% vremena bez terapije. Hepatotoksičnost se podjednako javljala u obe grupe bolesnika ($p>0,05$) (Grafikon 7). Broj epizoda leukopenije kod *TPMT* pozitivnih bolesnika nije bio statistički značajno veći u odnosu na nosioce *wild type* alela ($p>0,05$) (Grafikon 8).

Surogat markeri toksičnosti



Grafikon 7. Surogat markeri toksičnosti u odnosu na *TPMT* genotip

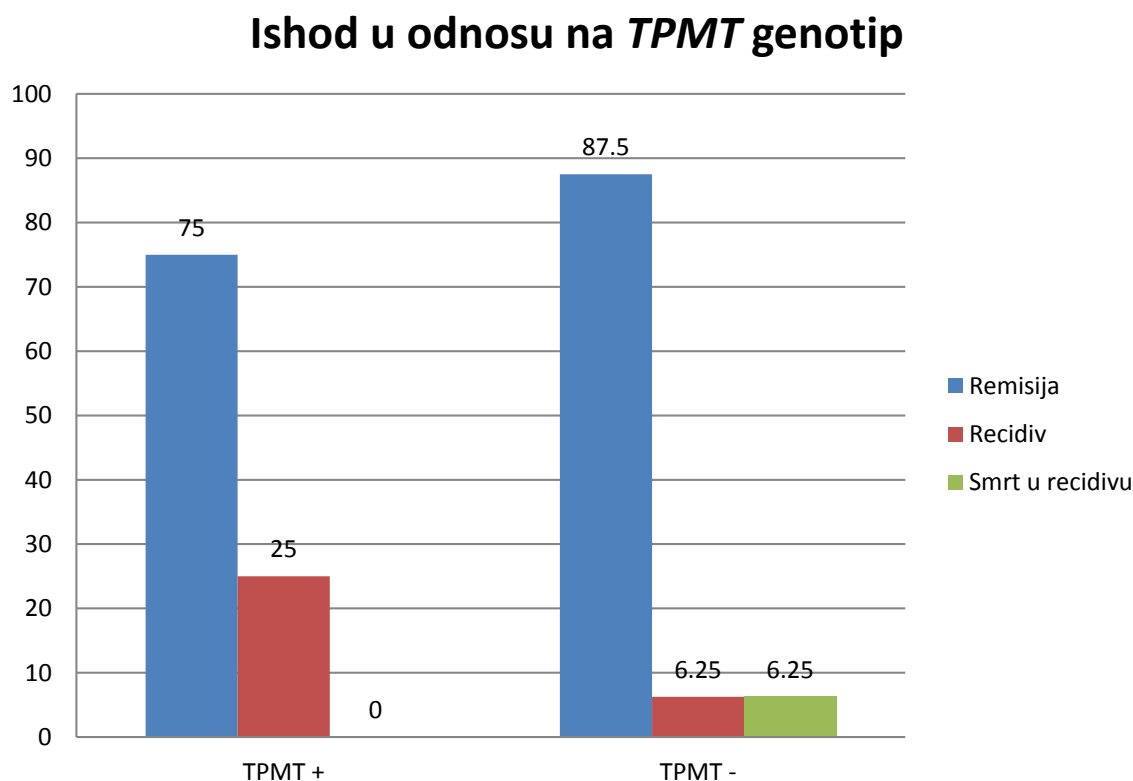
Broj epizoda leukopenije



Grafikon 8. Prosečan broj epizoda leukopenije u odnosu na *TPMT* genotip

Odsustvo uobičajenih komplikacija terapije 6-MP od bolesnika koji su bili *TPMT* pozitivni je najverovatnije posledica činjenice da je doza 6-MP smanjena tj. prilagođena *TPMT* genotipu koji je određen svim bolesnicima na početku terapije.

Ishod bolesti u odnosu na *TPMT* genotip je prikazan na grafikonu 9. Nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju ili pojavi recidiva među grupama bolesnika koji su nosioci *TPMT* varijante u odnosu na one koji su nosioci *wild type* alela ($p>0,05$).



Grafikon 9. Ishod bolesti (izražen u %) u odnosu na *TPMT* genotip

4.3 ITPA

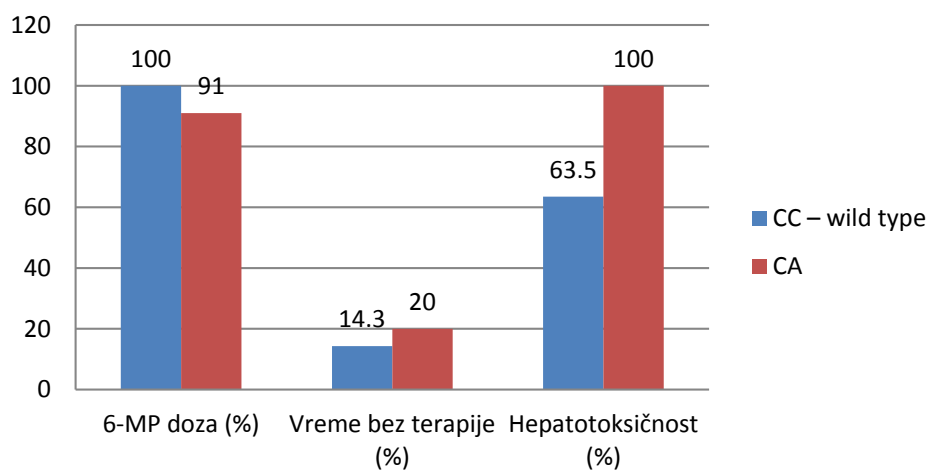
Pet bolesnika (7%) u našoj grupi su bili nosioci *ITPA* c.94CA alela (Tabela 3) i njihova medijana prosečne doze 6-MP je bila 91%. Pacijenti koji su bili nosioci *wild type ITPA* alela su imali medijanu prosečne doze 6-MP od 100%.

Tabela 3. Učestalost *ITPA* polimorfizama

<i>ITPA</i> c.94C>A		Broj	%	Broj	%
<i>ITPA</i> wild type	CC	63	93,0	63	93,0
<i>ITPA</i> varijanta	CA	5	7,0	5	7,0
	AA	0	/		

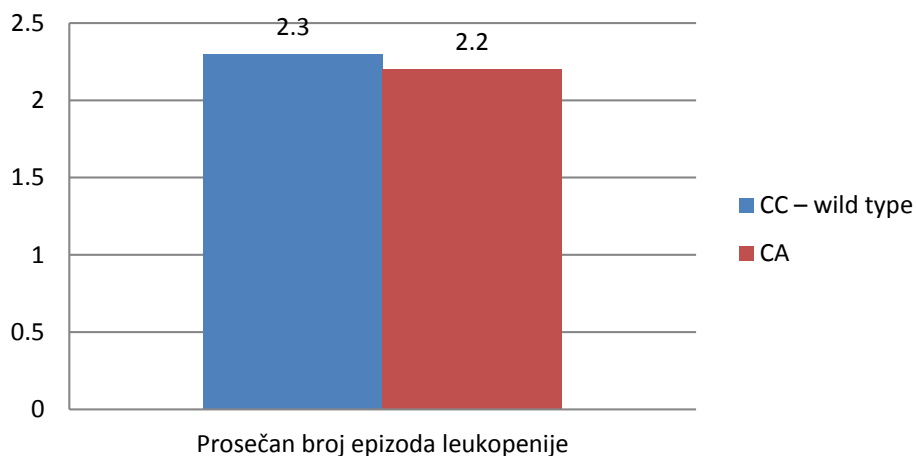
Nije bilo statistički značajne razlike između ovih grupa i dalja analiza nije uspela da potvrdi postojanje bilo kakve povezanosti između *ITPA* c.94CA genotipa i povećane 6-MP indukovane toksičnosti ($p>0,05$) (Grafikoni 10 i 11)

Surogat markeri toksičnosti



Grafikon 10. Surogat markeri toksičnosti u odnosu na *ITPA* genotip

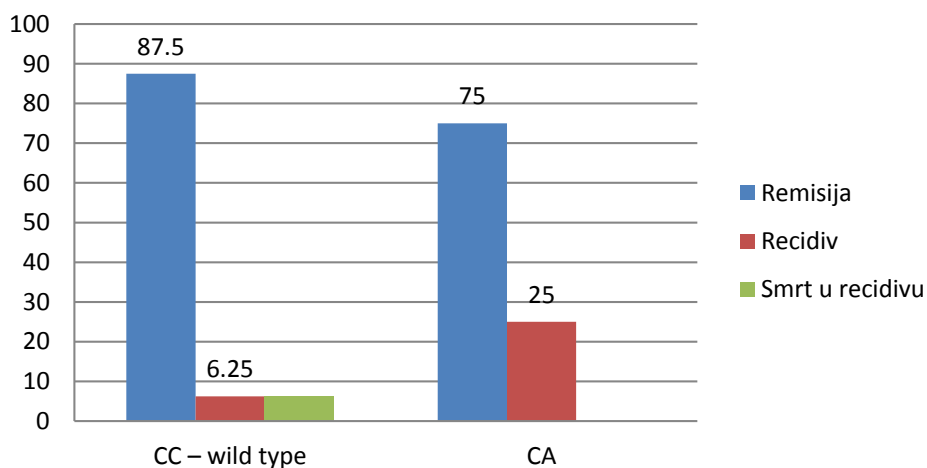
Broj epizoda leukopenije



Grafikon 11. Prosečan broj epizoda leukopenije u odnosu na *ITPA* genotip

Nije bilo statistički značajne razlike između nosilaca varijantnog alela i nosilaca *wild type* alela u ukupnog preživljavanju niti pojavi recidiva ($p > 0,05$) (Grafikon 12).

Ishod u odnosu na *ITPA* genotip

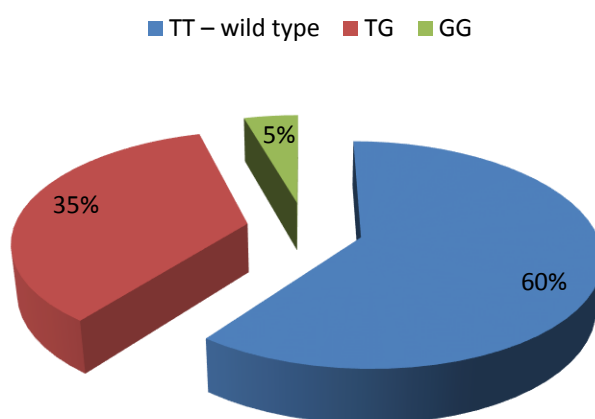


Grafikon 12. Ishod bolesti (izražen u %) u odnosu na *TPMT* genotip

4.4 ABCC4

ABCC4 c.*1372TT genotip (*wild type*) je bio prisutan u 60% naših bolesnika sa ALL, dok je heterozigot (*ABCC4* c.*1372TG) detektovan u 35% a homozigot (*ABCC4* c.*1372GG) u 5% bolesnika (Grafikon 13).

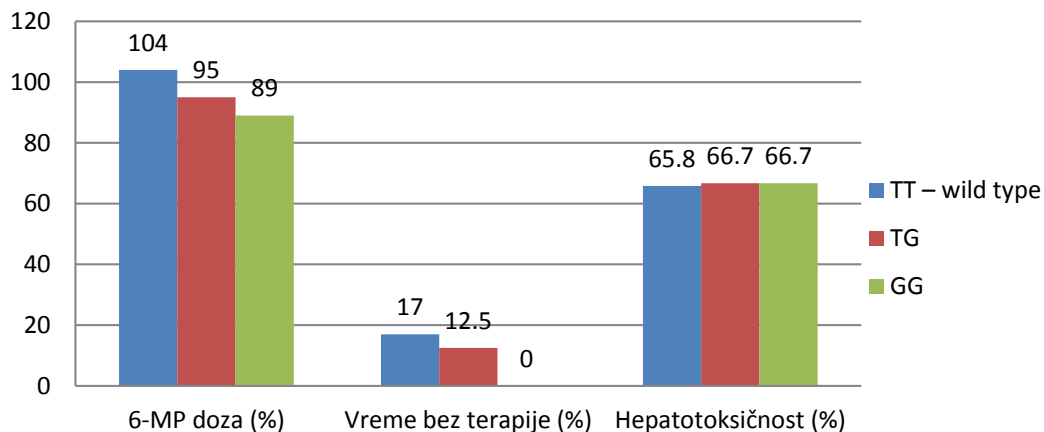
Varijante *ABCC4* c.*1372T>G



Grafikon 13. Učestalost *ABCC4* polimorfizama

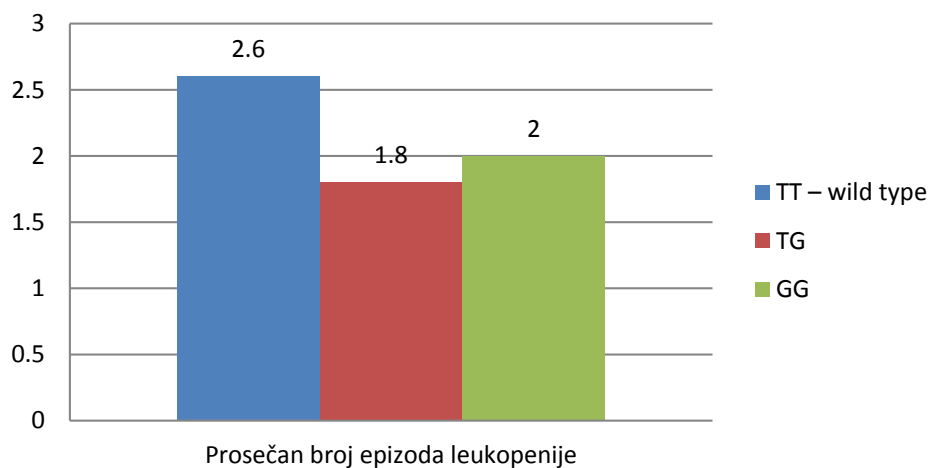
Kod nosilaca *ABCC4* c.*1372GG i *ABCC4* c.*1372TG genotipa, medijana prosečne doze 6-MP je bila 95% nasuprot 104% koliko je iznosila kod nosilaca *wild type* alela. Koristeći sva tri surogat markera toksičnosti, nismo uspeli da dokažemo da su nosioci *ABCC4* varijantnih alela imali izraženiju toksičnost uzrokovanu primenom 6-MP koristeći surogat markere ($p > 0,05$) (Grafikon 14 i 15).

Surogat markeri toksičnosti



Grafikon 14. Surogat markeri toksičnosti u odnosu na *ABCC4* genotip

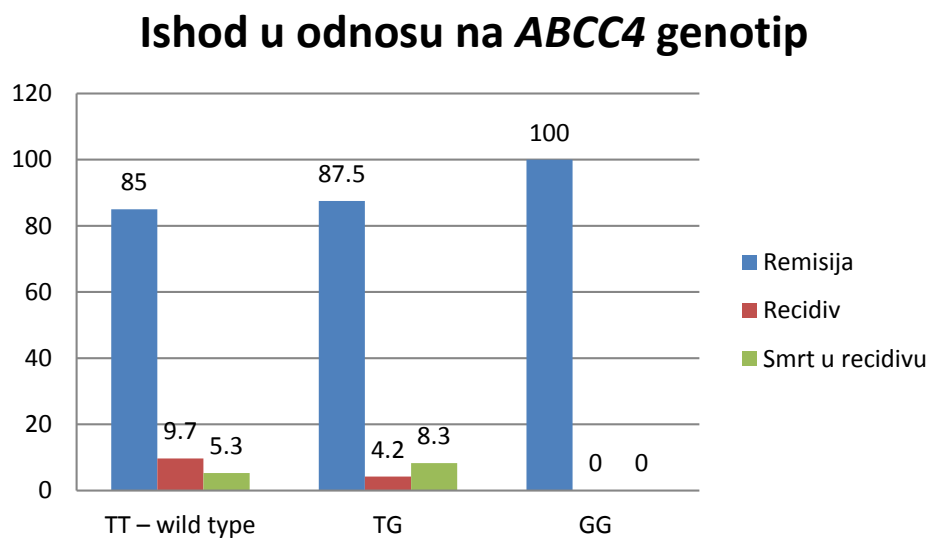
Broj epizoda leukopenije



Grafikon 15. Prosečan broj epizoda leukopenije u odnosu na *ABCC4* genotip

Ishod bolesti u odnosu na *ABCC4* genotip je prikazan na grafikonu 16. Nije uočena statistički značajna razlika u preživljavanju ili pojavi recidiva među grupama

bolesnika koji su nosioci *ABCC4* varijante odnosu na one koji su nosioci *wild type* alela ($p>0,05$).



Grafikon 16. Ishod bolesti (izražen u %) u odnosu na *ABCC4* genotip

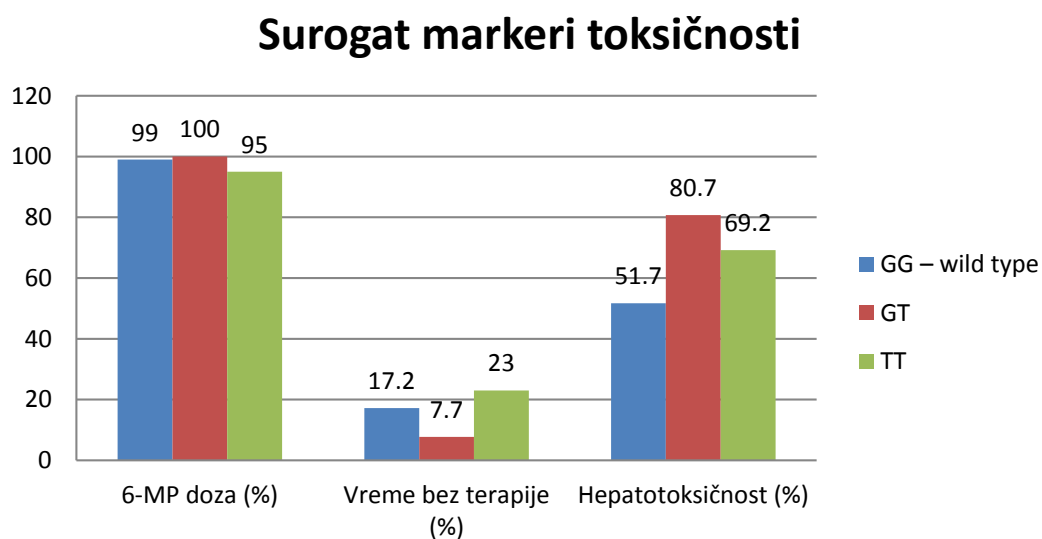
4.5 ABCB1

ABCB1c.2677TT genotip je u našoj seriji bolesnika detektovan u 19% a *ABCB1c.2677GT* genotip u 38% (Tabela 4).

Tabela 4. Učestalost *ABCB1* polimorfizama

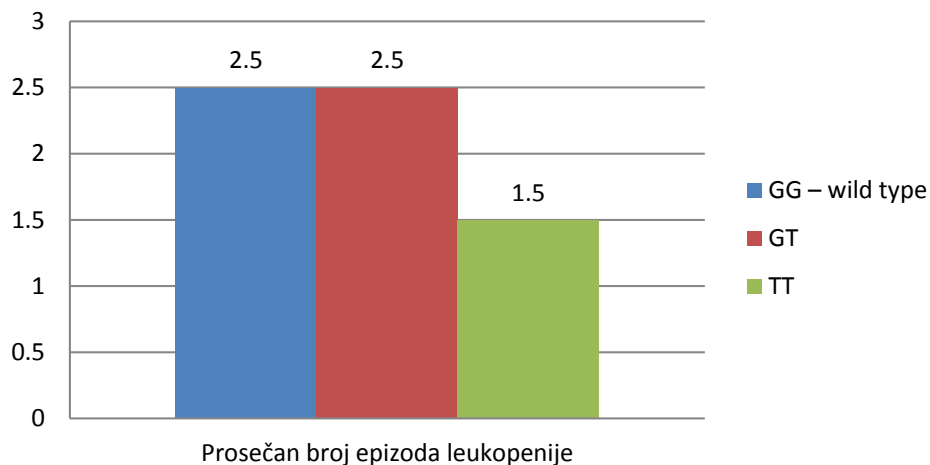
<i>ABCB1 c.2677G>T</i>		Broj	%	Broj	%
<i>ABCB1</i> wild type	GG	29	43,0	29	43,0
<i>ABCB1</i> varijanta	GT	26	38,0	39	57,0
	TT	13	19,0		

Medijana prosečne doze 6-MP kod bolesnika koji su bili nosioci *wild type* genotipa je bila 99%, kod heterozigotnih nosilaca je iznosila 100% a kod homozigotnih nosilaca varijantnog alela je bila 95%. Ni heterozigotni nosioci, ni homozigotni nosioci *ABCBI* varijantnih alela nisu ispoljili izraženiju mijelotoksičnost u toku lečenja 6-MP tokom faze održavanja ($p>0,05$). Broj epizoda leukopenije se nije značajno razlikovao među grupama, kao ni dužina vremena provedenog bez terapije ($p>0,05$) (Grafikoni 17 i 18). Međutim, uočeno je da su bolensici koji su bili nosioci za varijantne alele statistički značajno češće ispoljavali hepatotoksičnost ($p=0,030$) (Grafikon 17).



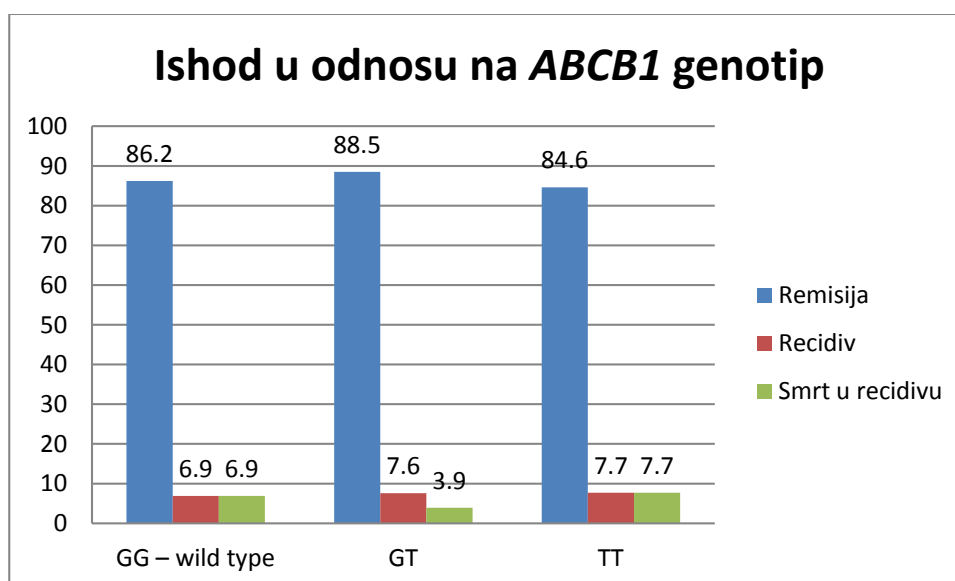
Grafikon 17. Surogat markeri toksičnosti u odnosu na *ABCBI* genotip

Broj epizoda leukopenije



Grafikon 18. Prosečan broj epizoda leukopenije u odnosu na *ABCB1* genotip

Nije postojala statistički značajna razlika u ishod bolesti u odnosu na *ABCB1* genotip među bolesnicima koji su nosioci varijantnog alela i onih koji su nosioci *wild type* alela ($p > 0,05$) (Grafikon 19).



Grafikon 19. Ishod bolesti (izražen u %) u odnosu na *ABCB1* genotip

4.6 FARMAKOGENETSKI PREDIKTIVNI MODEL ZA 6-MP INDUKOVANU TOKSIČNOST TOKOM TERAPIJE ODRŽAVANJA

Jedanaest bolesnika sa ALL koji su bili nosioci *wild type TPMT* alela su tolerisali iste ili niže prosečne doze 6-MP kao i nosioci *TPMT* varijantnih alela. Među ovih 11 bolesnika, četiri bolesnika su bili heterozigotni nosioci *ABCC4* varijantnog alela, *ABCC4c.*1372TG*, kao i četiri heterozigotna nosioca *ABCB1 c.2677GT* alela i četiri homozigotna nosioca *ABCB1 c.2677TT* alela. Ovi rezultati sugerišu da, pored posmatranih *TPMT* alela, gore navedeni varijantni aleli za *ABCC4* i *ABCB1* gen, treba da se uzmu u obzir kao dodatni farmakogenetski markeri koji mogu voditi individualizaciji terapije dečje ALL.

Različiti predikcioni modeli (Elastic net, Neural net and Random forest) su korišćeni za klasifikaciju pacijenta čije su srednje doze tokom čitave terapije održavanja bile ispod proseka (loša tolerancija terapije) ili iznad proseka (dobra tolerancija terapije). Nakon evaluiranja performansi ovih predikcionih modela koristeći vrednost AUC kao meru preciznosti klasifikovanja, pokazano je da se najbolji prediktivni model postiže analizom svih genetskih varijanti (*TPMT c.460G>A*, *TPMT c.719A>G*, *ITPA c.94C>A*, *ABCC4 c.*1372T>G* i *ABCB1 c.2677G>T*), iako nisu sve genetske varijante pojedinačno pokazale povezanost sa tolerancijom 6-MP terapije. Od tri korišćena prediktivna algoritma, Neural net algoritam je pokazao najbolje performanse za predikciju 6-MP tolerancije: AUC = 0.71 [95% CI: 0.59 – 0.83]. Ovo praktično znači da prema rezultatima našeg istraživanja, ovaj model može u 71% situacija, precizno da diskriminiše, na osnovu analiziranih genotipova, koji bolesnici će biti u grupi onih koji dobro tolerišu terapiju a koji oni kod kojih možemo očekivati povećanu toksičnost.

5 DISKUSIJA

Najveći broj do sada objavljenih studija koje su se analizirale toksične efekte tiopurinskih lekova je bio usmeren na bolesnike obolele od inflamatornih bolesti creva – IBD (eng. inflammatory bowel disease) i koji su lečeni primenom azatioprina, što je očekivano s obzirom da su IBD po učestalosti značajno češće od ALL, naročito kod dece (63). Međutim, iako retka bolest, ALL predstavlja 30% malignih bolesti dece, i sve više pažnje se poklanja istraživanjima u ovoj oblasti (50, 64, 65). Paralelno sa razvojem novih terapijskih opcija, novih antileukemijskih lekova i novih terapijskih protokola, praćenje neželjenih efekata, njihovo minimizovanje i optimizacija već postojeće terapije, postali su cilj modernog lečenja ALL (29).

Razvoj modernih metoda molekularne genetike omogućio je intenzivnija istraživanja na polju farmakogenetike, koja za cilj imaju personalizaciju terapije uz smanjenje neželjenih efekata lekova i istovremeno povećanje procenta preživljavanja (29).

Ovo je prva studija efekata farmakogenetskih varijanti gena *ABCC4*, *ITPA* i *ABCBI* kod dece obolele od akutne limoblastne leukemije u Srbiji. Farmakogenetske varijante *TPMT* gena su već posmatrane i izučavane u populaciji dece obolele od ALL u Srbiji (15).

Primena vodiča za korigovanje terapije shodno *TPMT* genotipu (40, 41) kod izvesnog broja bolesnika nije uspela da eliminiše ili redukuje pojavu toksičnih efekata terapije 6-MP, što praktično znači da interindividulane varijacije u stepenu toksičnosti ne mogu u potpunosti biti objašnjene *TPMT* polimorfizmima (66). Naime, kod određenog broja bolesnika, koji su u toku primene 6-MP razvili tešku mijelotoksičnost, manifestovanu, najpre teškom neutopenijom, trombocitopenijom,

anemijom ili čestim epizodama febrilne neutropenije, nije dokazano postojanje *TPMT* deficijencije koja bi mogla da objasni ovako izražene toksične efekte terapije. Za te bolesnike, pretpostavljeno je da mogu biti nosioci varijanti u drugim genima važnim za metabolizam 6-MP. Kao prvi se izdvojio gen *ITPA* (29, 43, 67, 68).

Učestalost varijantnog alela u *ITPA* genu, *ITPA* c.94CA, u našoj grupi ispitanika bila je 7%, što se slaže sa podacima iz literature za pripadnike bele rase, gde se prijavljuje učestalost od 5-7% (69). Učestalost je značajno veća kod Azijske populacije, gde se prijavljuje od 19% (69) do 28% kod dece obolele od ALL u Malaziji (70). Wan Rosalina i saradnici su pokazali da su nosioci varijantnih alela u *ITPA* genu, u većem riziku da razviju povišenu telesnu temperaturu, kao znak infekcije, i hepatotoksičnost tokom primene 6-MP u toku terapije održavanja (70). Takođe, u studiji koju su u Japanu sprovedi Tanaka i saradnici, pokazano je da *ITPA* genotip ima značajan uticaj na pojavu toksičnosti, naročito na ispoljavanje hepatotoksičnosti (71). Druga studija, objavljena od strane Stocco i saradnika je pokazala da su bolesnici koji su nosioci varijantnog alela u *ITPA* genu u većem riziku da razviju febrilnu neutropeniju, ali samo ukoliko im je doza 6-MP već prilagođena *TPMT* genotipu (67). Iako je učestalost pojave febrilne neutropenije bila povećana kod ovih bolesnika, to nije uticalo na smanjenje EFS, jer su sve epizode febrilne neutropenije promptno i agresivno lečene, primenom odgovarajućih antibiotika te je prekid u primeni 6-MP bio minimalan. U našoj studiji, nije zabeležena ni jedna epizoda febrilne neutropenije, što je verovatno posledica malog broja ispitanika. Naime, u našoj kohorti je bilo svega četiri *TPMT* pozitivna bolesnika, od kojih je samo jedan bio nosilac varijantnog alela u *ITPA* genu. Izražena toksičnost kod bolesnika koji su nosioci varijantnog alela u *ITPA* genu, koja je prisutna samo kod *TPMT* pozitivnih bolesnika se uklapa u dosadašnja saznanja da je *TPMT* dominantan način inaktivacije tiopurinskih lekova, i da se tek kod bolesnika koji su deficijentni za *TPMT*, aktiviraju, odnosno postaju dominantni drugi putevi inaktivacije tiopurinskih lekova, kao što je put preko *ITPA*. Ovo objašnjava, zašto varijante u *ITPA* genu ne utiču značajno na inaktivaciju 6-MP kod one dece kod kojih je očuvan primarni put inaktivacije – *TPMT*. U prilog povećane toksičnosti kod bolesnika koji

su nosioci varijantnog alela u genu *ITPA*, govori i povećana intracelularna koncentracija toksičnih 6-MP metabolita koja je uočena u studiji de Beaumais i saradnika (72). Međutim, neke studije nisu pokazale postojanje povezanosti između varijanti u genu za *ITPA* i toksičnih efekata terapije (73). Rezultati nešeg ispitivanja su pokazali da ne postoji povezanost između varijantnih alela u genu za *ITPA*, tj. da varijante *ITPA* gena ne mogu biti nezavisni prediktor toksičnosti uzrokovane 6-MP, bilo u smislu mijelotoksičnosti ili neželjenih reakcija kao što su simptomi slični gripu, osip i pankreatitis. Iako je u našoj grupi, doza 6-MP bila prilagođena prethodno određenom *TPMT* genotipu, rezultati se ne slažu sa ranije navedenim rezultatima studije Stocco i grupe autora (67). Kontradiktorni podaci u literaturi, pa i naše studije u odnosu na druge, mogu biti posledica relativno malog broja ispitanika, s obzirom da se radi o retkom oboljenju. Takođe, način na koji se definiše toksičnost tj. varijable koje se koriste kao surogat markeri mogu u značajnoj meri uticati na tumačenje rezultata. Sa druge strane, metabolizam lekova je veoma kompleksan i verovatno da postoje i alternativni metabolički putevi inaktivacije ili aktivacije lekova koji još uvek nisu dobro definisani, uz nepoznat uticaj genskih varijanti u drugim genima uključenim u metabolizam 6-MP.

ABCC4 gen kodira protein MRP4 čija je fiziološka uloga u organizmu da iz ćelija izbacuje štetna jedinjenja, u koja se ubrajaju i citostatici. Svojom fiziološkom ulogom ovaj protein vrši eliminaciju 6-MP iz ćelija i tako smanjuje njegovo citostatsko dejstvo (74, 75). Studije na životinjskim modelima su pokazale da je niska ekspresija *ABCC4* gena odgovorna za povećanu osetljivost na tiopurinske lekove i povećanu mijelotoksičnost (48). Povećana ekspresija *ABCC4* gena vodi povećanoj eliminaciji lekova iz ćelije, što dalje uslovljava manju koncentraciju 6-MP i njegovih aktivnih metabolita u ciljnim tkivima i na taj način se smanjuje terapijski efekat 6-MP. Uzevši sve to u obzir, može se pretpostaviti da bi povećana ekspresija *ABCC4* gena mogla biti odgovorna za terapijski neuspeh u lečenju ALL kod dece (47). Ovo je potvrđeno studijom Ansarija i saradnika, koji su pokazali da su varijante u *ABCC4* genu koje povećavaju ekspresiju MRP4 povezane sa smanjenim EFS (eng. event free survival) kod dece obolele od ALL (76). Naša studija je pokazala da je učestalost

varijantnih alela u *ABCC4* genu 34,7% za *ABCC4* c.*1372TG, odnosno 4,3% za *ABCC4* c.*1372GG. Statistička analiza nije pokazala povezanost varijantnih alela sa povećanom toksičnošću, niti sa lošijim preživljavanjem kod naših pacijenata.

ABCB1 transporter ili P-glikoprotein, kao efluks pumpa koja štiti ćeliju od toksičnih efekata ksenobiotika značajno utiče na efikasnost terapije i ispoljavanje terapijskih efekata lečenja. Pretpostavlja se da je smanjena aktivnost P-glikoproteina koja nastaje kao posledica snižene ekspresije *ABCB1* gena, odgovorna za povećanje rizika za nastanak malignih bolesti. Naime, nosioci manje funkcionalnih, varijantnih alela ovog gena, imaju smanjenu ekspresiju gena što vodi smanjenoj aktivnosti zaštitnog mehanizma koji P-glikoprotein obezbeđuje i samim tim povećanom nakupljanju toksičnih supstanci unutar ćelije. Neke studije su potvrdile ovu pretpostavku i pokazale povezanost pojave ALL i prisustva varijantnih alela *ABCB1* gena koji se odlikuju smanjenom ekspresijom P-glikoproteina (77, 78). Gregers i saradnici nisu pokazali ovakvu povezanost u svojoj studiji (79). Učestalost varijanti u *ABCB1* genu, *ABCB1*c.2677GT i *ABCB1* c.2677TT u Koreanskoj populaciji dece sa ALL je 36% i 9% (80). U našoj grupi ispitanika učestalosti istih varijanti su bile 38% i 19%. Takođe, ista studija na populaciji Koreanske dece obolele od ALL nije uspela da dokaže povezanost varijantnih alela u *ABCB1* genu sa povećanom mijelotoksičnošću i ishodom (80). Naši rezultati su u saglasnosti sa ovom studijom, jer nismo uspeli da dokažemo postojanje povezanosti varijanti u *ABCB1* genu i povećanog rizika za razvoj toksičnosti, tj. nismo uspeli da potvrdimo da bi ova varijanta mogla da bude nezavisan prediktor mijelotoksičnosti. U našoj studiji je pokazano da postoji povećana incidenca pojave hepatotoksičnosti kod bolesnika koji su nosioci varijantnih alela *ABCB1* gena. Ovaj rezultat se verovatnije može objasniti istovremenom primenom metotreksata, nego kao neželjeni efekat primene 6-MP (48). Gregers i saradnici su ispitivali povezanost varijanti u *ABCB1* genu i mijelotoksičnosti i hepatotoksičnosti i nisu uspeli da dokažu povezanost *ABCB1*c.2677GT i *ABCB1* c.2677TT varijanti sa hepatotoksičnošću ali su pokazali povećanu učestalost mijelotoksičnosti kod nosioca varijantnih alela (79).

Univarijantna analiza naših bolesnika nije uspjela da pokaže povezanost posmatranih genskih varijanti sa povećanom mijelotoksičnošću, osim za dobro poznatu povezanost u varijantama u *TPMT* genu (53, 81).

Razvijanje predikcionog modela zasnovanog na genetskim podacima, koji bi mogao da proceni verovatnoću razvoja toksičnosti u toku terapije 6-MP, je bio jedan od osnovnih ciljeva studije. Do sada nije bilo studija koje su analizirale 6-MP toleranciju ili toksičnost koristeći prediktivne modele u kojima su ulazne varijable specifične genske varijante. U našoj studiji su korišćena tri klasifikaciona algoritma a onaj sa najboljom predikcijom je procenjen koristeći Neural net algoritam, kojim je postignuto da se jasno diskriminišu bolesnici koji će imati dobru toleranciju, odnosno lošu toleranciju u 71% slučajeva. Primena ovog modela je podrazumevala upotrebu svih analiziranih genskih varijanti a ne samo onih za koje smo pokazali statistički značajnu univarijantnu povezanost, jer smo smatrali da udruženost nekih varijanti može doprineti boljoj predikciji toksičnosti (82). U našoj grupi ispitanika nismo imali sve moguće kombinacije varijanti za sve ispitivane genske markere. Ovo je posledica relativno male kohorte bolesnika i može se posmatrati kao ograničenje naše studije, ali treba imati u vidu da se radi o retkoj bolesti i da je ispitivanje rađeno u pedijatrijskoj populaciji. Bez obzira na gore navedeno, predikcioni model je pokazao da se svi ispitivani geni (*ITPA*, *ABCC4* i *ABCB1*), a ne samo varijante u *TPMT* genu za koji smo pokazali univarijantnu povezanost, mogu koristiti kao prediktori 6-MP toksičnosti tokom terapije održavanja u lečenju ALL kod dece. Mi predažemo da se varijante *TPMT* c.460G>A, *TPMT* c.719A>G, *ITPA* c.94C>A, *ABCC4* c.*1372T>G i *ABCB1* c.2677G>T uvrste u stratifikacione algoritme, kojima će se identifikovati oni bolesnici koji su u većem riziku da razviju značajnu mijelotoksičnost. Razvoj značajne mijelotoksičnosti tokom terapije održavanja zahteva obustavljanje primene 6-MP što daje mogućnost da dođe do reaktivacije malignih ćelija tj. do povećanja rizika za nastanak recidiva bolesti.

Deca obolele od akutne limfoblastne leukemije, boluju od retke bolesti sa visokom stopom izlečenja. Međutim, i dalje postoji jedan broj bolesnika, oko 10%, koji u toku lečenja razviju komplikacije i imaju nepovoljan ishod terapije. U tom

smislu, razvoj terapijskih strategija, koje su efikasne i koje dozvoljavaju kontinuiranu primenu potrebnih citostatika bez izraženih toksičnih efekata, predstavlja osnovu lečenja ALL kod dece. U sklopu takvih terapijskih strategija, personalizovan pristup svakom bolesniku, na osnovu individualnog genskog profila, je od izuzetnog značaja. Analiziranje farmakogenomskog profila bolesnika i podataka o toksičnosti predstavlja put u istraživanju koji za sada daje najviše mogućnosti za razvoj personalizovane medicine. Razvoj novih medicinskih tehnologija, naročito iz domena molekularne genetike, koje omogućavaju brzu obradu velikog broja gena i velikog broja podataka, kao što je sekvenciranje naredne generacije (eng. NGS, next generation sequencing), olakšaće analizu svih poznatih gena koji su relevantni za metabolizam 6-MP kod svakog bolesnika obolelog od ALL. Analiziranje povezanosti ovih genskih podataka sa podacima o razvoju i intenzitetu toksičnosti tokom terapije održavanja, omogućiće dizajniranje panela farmakogenomskih markera za predviđanje 6-MP indukovane toksičnosti kod dece obolele od ALL.

6 ZAKLJUČAK

1. Učestalosti ispitivanih genskih varijanti u Srbiji među decom obolelom od ALL:
 - a. Učestalost varijanti u genu za *TPMT* u populaciji dece obolele od ALL u Srbiji se ne razlikuje značajno od učestalosti u drugim evropskim populacijama i iznosi 4,3% za *TPMT**3A i 1,5% za *TPMT**3C.
 - b. U našoj studiji je detektovana varijanta *ITPA* c.94CA sa učestalošću od 7%, što odgovara učestalosti u drugim evropskim populacijama.
 - c. U *ABCC4* genu, heterozigotni nosioci varijante (*ABCC4* c.*1372TG) su detektovani u 35% a homozigotni (*ABCC4* c.*1372GG) u 5% ispitivane populacije, što je nešto više od drugih evropskih populacija.
 - d. U našoj studiji varijante u *ABCB1* genu su detektovane u 19% za *ABCB1*c.2677TT varijantu i u 38% za *ABCB1*c.2677GT varijantu, što odgovara učestalosti u evropskim populacijama.
2. Korelacija prisutnih genetičkih varijanti u genima i ispoljene toksičnosti:
 - a. Nosioci varijante u *TPMT* genu su bili na značajno nižim prosečnim dozama 6-MP u odnosu na bolesnike koji su bili nosioci *wild type* gena.
 - b. U našem ispitivanju nije dokazana korelacija između prisustva varijanti u *ITPA* genu i ispoljavanja toksičnih efekata.
 - c. Korelacija između varijanti u *ABCC4* genu i pojave mijelotoksičnosti nije dokazana ali je dokazana povezanost ove varijante i pojave hepatotoksičnosti
 - d. U našem ispitivanju nije dokazana koralacija između prisustva varijanti u *ABCB1* genu i ispoljavanja toksičnih efekata .
3. Ova studija je pokazala da se primenom predikcionih modela u kojima su ulazne varijable, varijante *TPMT* c.460G>A, *TPMT* c.719A>G, *ITPA* c.94C>A, *ABCC4* c.*1372T>G i *ABCB1* c.2677G>T, u 71% slučajeva, mogu

identifikovati bolesnici koji su u povećanom riziku da razviju izraženu mijelotoksičnost u toku primene 6-MP tokom terapije održavanja.

4. Uticaj prisutnosti varijanti u genima *TMPT*, *ITPA*, *MRP4* i *ABCB1* na ishod dece obolele od ALL:
 - a. Nije dokazana povezanost nosilaca varijanti *TPMT* c.460G>A, *TPMT* c.719A>G i krajnjeg ishoda lečenja bolesnika.
 - b. Nije dokazana povezanost nosilaca varijante *ITPA* c.94C>A i krajnjeg ishoda lečenja.
 - c. Nije dokazana povezanost nosilaca varijante *ABCC4* c.*1372T>G i krajnjeg ishoda lečenja.
 - d. Nije dokazana povezanost nosilaca varijante *ABCB1* c.2677G>T i krajnjeg ishoda lečenja.

7 LITERATURA

1. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
3. Lim JY, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2014;120(7):955-62.
4. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England journal of medicine*. 2015;373(16):1541-52.
5. Lee P, Bhansali R, Izraeli S, Hijiya N, Crispino JD. The biology, pathogenesis and clinical aspects of acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. *Leukemia*. 2016;30(9):1816-23.
6. Duployez N, Lejeune S, Renneville A, Preudhomme C. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia with genetic predispositions: a new challenge for hematologists. *Expert review of hematology*. 2016;9(12):1189-202.
7. Čturiilo G. Klinička genetika u pedijatrijskoj praksi. Beograd: Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu; 2015.
8. Reddy P, Shankar R, Koshy T, Radhakrishnan V, Ganesan P, Jayachandran PK, et al. Evaluation of Cytogenetic Abnormalities in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2019;35(4):640-8.
9. Greaves MF. Speculations on the cause of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1988;2(2):120-5.

10. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2018;18(8):471-84.
11. Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015;100(3):295-9.
12. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiation research*. 1994;137(2 Suppl):S68-97.
13. Infante-Rivard C, Guiguet M. Family history of hematopoietic and other cancers in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer detection and prevention*. 2004;28(2):83-7.
14. Boice JD, Jr. The danger of X-rays--real or apparent? *The New England journal of medicine*. 1986;315(13):828-30.
15. Ward G. The infective theory of acute leukemia. *Br J Child Dis* 1917;14:10-20.
16. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a Scottish new town with nuclear reprocessing sites in Britain. *Lancet*. 1988;2(8624):1323-7.
17. Kinlen LJ. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *British journal of cancer*. 1995;71(1):1-5.
18. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(3):193-203.
19. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014;6(1):e2014073.
20. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2006;354(2):166-78.

21. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2007;370(9583):240-50.
22. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). Position paper on Terminology in Pharmacogenetics (EMA/CPMP/3070/01). London 2002.
23. Dale Ra. Resorpcija i raspodela lekova. *Farmakologija*. Beograd: Data Status; 2005.
24. Dale Ra. Individualne varijacije i interakcije između lekova. *Farmakologija*. 5th ed. Beograd: Data Status; 2005.
25. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics*. 1998;8(4):283-9.
26. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001;2:9-39.
27. Evans WE, Relling MV, Rodman JH, Crom WR, Boyett JM, Pui CH. Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*. 1998;338(8):499-505.
28. Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American journal of human genetics*. 1980;32(5):651-62.
29. Rudin S, Marable M, Huang RS. The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2017;15(2):82-93.

30. Dale Ra. Hemioterapija kancera. Farmakologija. 5th ed. Beograd: Data Status; 2005.
31. Balis FM HJ, Poplack AP. General principles of chemotherapy. Pizzo AP and Poplack DG. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott company; 2001. p. 210-45.
32. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *European journal of clinical pharmacology*. 2008;64(8):753-67.
33. Aarbakke J, Janka-Schaub G, Elion GB. Thiopurine biology and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*. 1997;18(1):3-7.
34. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European journal of clinical pharmacology*. 1992;43(4):329-39.
35. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, et al. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*. 1996;273(5278):1109-11.
36. Allan PW, Bennett LL, Jr. 6-Methylthioguanilic acid, a metabolite of 6-thioguanine. *Biochemical pharmacology*. 1971;20(4):847-52.
37. Lennard L, Chew TS, Lilleyman JS. Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *British journal of clinical pharmacology*. 2001;52(5):539-46.
38. Lennard L, Gibson BE, Nicole T, Lilleyman JS. Congenital thiopurine methyltransferase deficiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukaemia. *Archives of disease in childhood*. 1993;69(5):577-9.
39. Paugh SW, Stocco G, Evans WE. Pharmacogenomics in pediatric leukemia. *Current opinion in pediatrics*. 2010;22(6):703-10.
40. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for

thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2013;93(4):324-5.

41. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui CH, Yee SW, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011;89(3):387-91.

42. Abla N, Chinn LW, Nakamura T, Liu L, Huang CC, Johns SJ, et al. The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;325(3):859-68.

43. Azimi F, Mortazavi Y, Alavi S, Khalili M, Ramazani A. Frequency of ITPA gene polymorphisms in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia and prediction of its myelosuppressive effects. *Leukemia research*. 2015;39(10):1048-54.

44. Shipkova M, Franz J, Abe M, Klett C, Wieland E, Andus T. Association between adverse effects under azathioprine therapy and inosine triphosphate pyrophosphatase activity in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Therapeutic drug monitoring*. 2011;33(3):321-8.

45. Farfan MJ, Salas C, Canales C, Silva F, Villarroel M, Kopp K, et al. Prevalence of TPMT and ITPA gene polymorphisms and effect on mercaptopurine dosage in Chilean children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC cancer*. 2014;14:299.

46. Xiong H, Xin HW, Wu XC, Li Q, Xiong L, Yu AR. Association between inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency and azathioprine-related adverse drug reactions in the Chinese kidney transplant recipients. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2010;24(3):393-400.

47. Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, et al. Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer research*. 2008;68(13):4983-9.

48. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Pinan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, et al. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(2):53-61.
49. Balamurugan S, Sugapriya D, Shanthi P, Thilaka V, Venkatadesilalu S, Pushpa V, et al. Multidrug resistance 1 gene expression and AgNOR in childhood acute leukemias. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2007;23(3-4):73-8.
50. Zhai X, Wang H, Zhu X, Miao H, Qian X, Li J, et al. Gene polymorphisms of ABC transporters are associated with clinical outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Archives of medical science : AMS*. 2012;8(4):659-71.
51. Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, vander Kolk DM, Daenen SM, Faber KN, et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(24 Pt 1):8661-8.
52. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, Castillo L, Dibar E, Donska S, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(3):174-84.
53. Dokmanovic L, Urosevic J, Janic D, Jovanovic N, Petrucev B, Tomic N, et al. Analysis of thiopurine S-methyltransferase polymorphism in the population of Serbia and Montenegro and mercaptopurine therapy tolerance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic drug monitoring*. 2006;28(6):800-6.
54. Kotur N. Farmakogenetika 6-merkaptopurina i metotreksata u dečjoj akutnoj limfoblastnoj leukemiji. Beograd: Univerzitet u Beogradu; 2015.

55. Penna G, Allegra A, Alonci A, Aguenouz M, Garufi A, Cannavo A, et al. MDR-1 polymorphisms (G2677T and C3435T) in B-chronic lymphocytic leukemia: an impact on susceptibility and prognosis. *Med Oncol.* 2011;28(4):1549-54.
56. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Tai HL, Pui CH, et al. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of internal medicine.* 1997;126(8):608-14.
57. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit Lett* 2006;27(8):861-74.
58. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of statistical software.* 2010;33(1):1-22.
59. Venables W, Ripley B. *Modern Applied Statistics With S.* 4th ed. New York: Springer; 2002.
60. Liaw A, Wiener M. Classification and regression by random forest. *R News.* 2002;2:18-22.
61. Sing T, Sander O, Beerenwinkel N, Lengauer T. ROCR: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics.* 2005;21(20):3940-1.
62. Freeman EA, Moisen G. PresenceAbsence: An R Package for Presence-Absence Model Analysis. *Journal of statistical software.* 2008;23(11):1-31.
63. Al Hadithy AF, de Boer NK, Derijks LJ, Escher JC, Mulder CJ, Brouwers JR. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver.* 2005;37(4):282-97.

64. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(2):83-103.
65. Stocco G, Franca R, Verzegnassi F, Londero M, Rabusin M, Decorti G. Multilocus genotypes of relevance for drug metabolizing enzymes and therapy with thiopurines in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Genetics*. 2013;3.
66. Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(11):1235-42.
67. Stocco G, Cheok MH, Crews KR, Dervieux T, French D, Pei D, et al. Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;85(2):164-72.
68. Stocco G, Crews KR, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine-triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status. *Expert opinion on drug safety*. 2010;9(1):23-37.
69. Marsh S, Van Booven DJ. The increasing complexity of mercaptopurine pharmacogenomics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;85(2):139-41.
70. Wan Rosalina WR, Teh LK, Mohamad N, Nasir A, Yusoff R, Baba AA, et al. Polymorphism of ITPA 94C>A and risk of adverse effects among patients with acute lymphoblastic leukaemia treated with 6-mercaptopurine. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2012;37(2):237-41.
71. Tanaka Y, Manabe A, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, et al. The activity of the inosine triphosphate pyrophosphatase affects toxicity of 6-

mercaptopurine during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese children. *Leukemia research*. 2012;36(5):560-4.

72. Adam de Beaumais T, Fakhoury M, Medard Y, Azougagh S, Zhang D, Yakouben K, et al. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *British journal of clinical pharmacology*. 2011;71(4):575-84.

73. Hawwa AF, Collier PS, Millership JS, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, et al. Population pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of 6-mercaptopurine in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of clinical pharmacology*. 2008;66(6):826-37.

74. Keppler D. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of experimental pharmacology*. 2011(201):299-323.

75. Belinsky MG, Guo P, Lee K, Zhou F, Kotova E, Grinberg A, et al. Multidrug resistance protein 4 protects bone marrow, thymus, spleen, and intestine from nucleotide analogue-induced damage. *Cancer research*. 2007;67(1):262-8.

76. Ansari M, Sauty G, Labuda M, Gagne V, Laverdiere C, Moghrabi A, et al. Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;114(7):1383-6.

77. Jamroziak K, Robak T. Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies. *Hematology*. 2004;9(2):91-105.

78. Rao DN, Anuradha C, Vishnupriya S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, et al. Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2010;11(4):1063-6.

79. Gregers J, Green H, Christensen IJ, Dalhoff K, Schroeder H, Carlsen N, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(4):372-9.

80. Kim H, Kang HJ, Kim HJ, Jang MK, Kim NH, Oh Y, et al. Pharmacogenetic analysis of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a possible association between survival rate and ITPA polymorphism. *PloS one*. 2012;7(9):e45558.
81. Dokmanovic L, Janic D, Krstovski N, Zukic B, Tosic N, Pavlovic S. Importance of genotyping of thiopurine S-methyltransferase in children with acute lymphoblastic leukaemia during maintenance therapy. *Srp Arh Celok Lek*. 2008;136(11-12):609-16.
82. Evans DM, Visscher PM, Wray NR. Harnessing the information contained within genome-wide association studies to improve individual prediction of complex disease risk. *Human molecular genetics*. 2009;18(18):3525-31.

BIOGRAFIJA AUTORA

Goran Milošević je rođen 28. jula 1983. godine u Kragujevcu. Osnovnu školu i gimnaziju u Kragujevcu je završio sa odličnim uspehom.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao 2002. godine i diplomirao 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,6.

Tokom 2011. godine bio je zaposlen u Republičkom zavodu za sport i medicine sporta Srbije. Od aprila 2011. godine volontirao je u Službi za hematologiju i onkologiju, Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, a od juna 2013. godine je zaposlen za stalno u gore navedenoj ustanovi.

Doktorske studije iz Medicinske farmakologije upisao je 2011. godine, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Specijalizaciju iz pedijatrije upisao je u aprilu 2015. godine, a specijalsitički ispit je položio sa odličnim uspehom 30. januara 2019. godine.

Proveo je mesec dana na usavršavanju u Jedinici za transplantaciju koštane srži, Službe za hematologiju i onkologiju pedijatrijskog odeljenja, Univerziteta Milan-Bicocca, MBBM Fondacije u bolnici San Gerardo u Monci, Italija 2013. godine. Dalje usavršavanje iz oblasti hematologije je nastavio u Službi za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju bolnice San Orsola-Malpighi, Univerziteta u Bolonji, 2015. godine.

Objavio je 37 naučnih radova, od kojih je šest radova štampano u celini u časopisima sa JCR liste, u kojima je prvi autor u jednom radu i saradnik u pet radova. Jedan rad je objavio u celosti u zborniku sa nacionalnog skupa. Ostale radove je objavio u vidu sažetaka u zbornicima nacionalnih i međunarodnih skupova. Publikovani radovi su iz oblasti pedijatrijske hematologije i medicinske farmakologije.

Aktivno govori engleski jezik, a pasivno se služi nemačkim jezikom.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Goran Milošević

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZNAČAJNIH ZA FARMAKOKINETIKU 6-MERKAPTOPURINA NA LEČENJE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEUKEMIJE U DECE

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.11.2019. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Goran Milošević

Broj upisa _____

Studijski program Medicinska farmakologija

Naslov rada UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZNAČAJNIH ZA FARMAKOKINETIKU
5-MERKAPTOPURINA NA LEČENJE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEUKEMIJE U
DECE

Mentor Prof. dr Lidija Krivokapić Dokmanović

Komentor Prof. dr Milica Bajčetić

Potpisani Goran Milošević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.11.2019. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA ZNAČAJNIH ZA FARMAKOKINETIKU 6-MERKAPTOPURINA NA LEČENJE AKUTNE LIMFOBLASTNE LEUKEMIJE U DECE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.11.2019. godine

